Orsay
Rob 2e2133

THESE

présentée à l'Université PARIS XI
centre d'ORSAY

pour obtenir le
titre de

DOCTEUR (3ème CYCLE)
spécialité: BIOCHIMIE

par

Armand BERNEMAN

Etude d'effecteurs naturels ou synthétiques régulateurs de la division cellulaire chez les eucaryotes.

Soutenue le 1er Juillet 1976 devant la commission d'examen

M.	E. LEDERER	Président
MM.	M. LAMBIOTTE P. VIGIER	Examinateurs
Mmes.	M. ROBERT-GERO M. LENFANT	

THESE

présentée à l'Université PARIS XI
centre d'ORSAY

pour obtenir le
titre de

DOCTEUR (3ème CYCLE)
spécialité: BIOCHIMIE

par

Armand BERNEMAN

Etude d'effecteurs naturels ou synthétiques régulateurs de la division cellulaire chez les eucaryotes.

Soutenue le 1er Juillet 1976 devant la commission d'examen

M.	E. LEDERER	Président
MM.	M. LAMBIOTTE P. VIGIER	Examinateurs
Mmes.	M. ROBERT-GERO M. LENFANT	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette thèse a été accomplie dans le Laboratoire du Professeur Lederer. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accueilli et aidé à résoudre les divers problèmes qui se posaien à moi. Qu'il reçoive ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je remercie très vivement le Professeur P. Vigier et Monsieur le Dr. M. Lambiotte d'avoir accepté de faire partie de mon jury ; je leur suis reconnaissant de leurs enseignements et des conseils qu'ils m'ont prodigués.

Je remercie Madame Lenfant de m'avoir guidé dans la première partie de cette thèse ; son sens de la persévérance et son enthousiasme m'ont été précieux.

La deuxième partie de ce travail s'est effectuée au sein de l'équipe animée par Madame Robert-Géro : l'ambiance réellement chaleureuse et studieuse ne pouvait que stimuler mon goût pour la recherche. Que Mme Robert-Géro sache combien son aide et son soutien m'ont été très précieux et combien j'ai apprécié sa rectitude.

Que tous mes camarades qui m'ont encouragés au cours de ce travail, trouvent ici l'expression de mon amitié.

Je tiens également à remercier Mlle S. Pichon qui a bien voulu assurer avec compétence la dactylographie de cette thèse.

Ce travail a bénéficié d'une aide de la part de la Compagnie Roussel-Uclaf pour la première partie et de la Ligue Nationale Française contre le Cancer pour la deuxième partie. Je leur adresse ma reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548109_0012

- LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES -

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARN_t : Acide ribonucléique de transfert

ATC : Acide trichloracétique

FEP : Fibroblastes d'embryon de poulet

PBS : Phosphate Buffer Saline (milieu salin pour les cellules)

SAH : S adénosyl homocystéine

SAM : S adénosyl méthionine

u.f.f.: Unité de formation de foyers

V.S.R.: Virus du Sarcome de Rous

- TABLE DES MATIERES -

PREMIERE PARTIE / ....

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE REGULANT LA DIVISION CELLULAIRE DANS LE FOIE FOETAL

INTRODUCTION

I - Le cycle cellulaire chez les mammifères 2

II - Présence d'inhibiteurs de la division cellulaire dans le foie 8

CHAPITRE I

Mise au point d'une méthode permettant de mesurer l'activité biologique d'un extrait de foie

I - Les problèmes 10

II - Matériel et Méthodes 14

III - Résultats et Discussion 16

Conclusion 23

CHAPITRE II

Etude d'un extrait de foie de rat : recherche d'une activité régulant la division des hépatocytes

I - Fractionnement 24

II - Propriétés de la fraction C_3 36

III - Spécificité de la fraction active 40

IV - Action d'un extrait de rein et de rate sur des hépatocytes de rat foetal en culture 44

Conclusion 46

Publications 48

Bibliographie 49

DEUXIEME PARTIE / 52

EFFETS D'ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA L SAH SUR LA TRANSFORMATION DE FIBROBLASTES D'EMBRYON DE POULET PAR LE VIRUS DU SARCOME DE ROUS

INTRODUCTION

I - Méthylation et carcinogénèse 53

II - Existence d'effecteurs naturels des méthylases 54

III - Hypothèse de travail 56

CHAPITRE I

Etude comparée d'analogues structuraux synthétiques de la SAH sur la croissance de fibroblastes d'embryons de poulet et leur transformation par le virus du Sarcome de Rous

I - Analogues structuraux synthétiques étudiés 59

II - Matériel et méthodes 61

III - Action d'analogues structuraux synthétiques de la SAH 63

CHAPITRE II

Action comparée de la L-SAH et de la SIBA sur des FEP normaux ou transformés par le VSR

I - Effets sur la croissance des FEP 70

II - Action comparée de la L SAH et de la SIBA sur la transformation 75

III - Effet comparé de la L SAH et de la SIBA sur la production virale 76

CHAPITRE III

Approche du mécanisme d'action de la SIBA

I - Etude de l'activité ARN_t-méthylasique de FEP "in vitro" 78

II - Effet de la L SAH et de la SIBA sur la pénétration et l'incorporation de la méthionine (^3H-méthyle) par des FEP normaux ou transformés, en culture 81

III - Effet de la SIBA et de la L SAH sur des synthèses macromoléculaires de FEP normaux ou transformés 87

IV - Conclusion 100

CHAPITRE IV 101

Discussion et conclusion générale

Publications 102

Bibliographie 103

PREMIERE PARTIE

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE REGULANT LA DIVISION CELLULAIRE

DANS LE FOIE DE RAT

- INTRODUCTION -

I - LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES MAMMIFERES

A) Généralités

La plupart des cellules d'un tissu sont capables d'effectuer au moins trois types de synthèses protéiques fondamentaux, à l'exception de quelques cellules comme les neurones et les érythrocytes humains qui ne se divisent pas:

1. la synthèse d'enzymes nécessaires aux étapes vitales du métabolisme (par exemple le cycle de Krebs et les phosphorylations).

2. la synthèse de protéines et d'enzymes dont dépend la mitose.

3. la synthèse de protéines et d'enzymes qui dirigent les activités spécifiques du tissu.

Ces deux derniers types de synthèses caractérisent chacun une étape de la vie cellulaire et semblent devoir être faits indépendamment l'un de l'autre.

Il a ainsi été observé (1) qu'il doit exister deux étapes dans la vie cellulaire :

- une étape pendant laquelle la cellule joue un rôle fonctionnel, spécifique du tissu auquel elle appartient.

- une autre étape où la cellule subit une séquence ordonnée d'évènements bien définis pour aboutir à sa division.

On peut définir le cycle cellulaire comme étant la période et les évènements qui s'échelonnent depuis la division d'une cellule jusqu'à l'achèvement de la division suivante

.../...

Traditionnellement, on adopte le schéma de Howard et Pelc (1) qui distingue quatre phases dans le cycle cellulaire (fig. 1) :

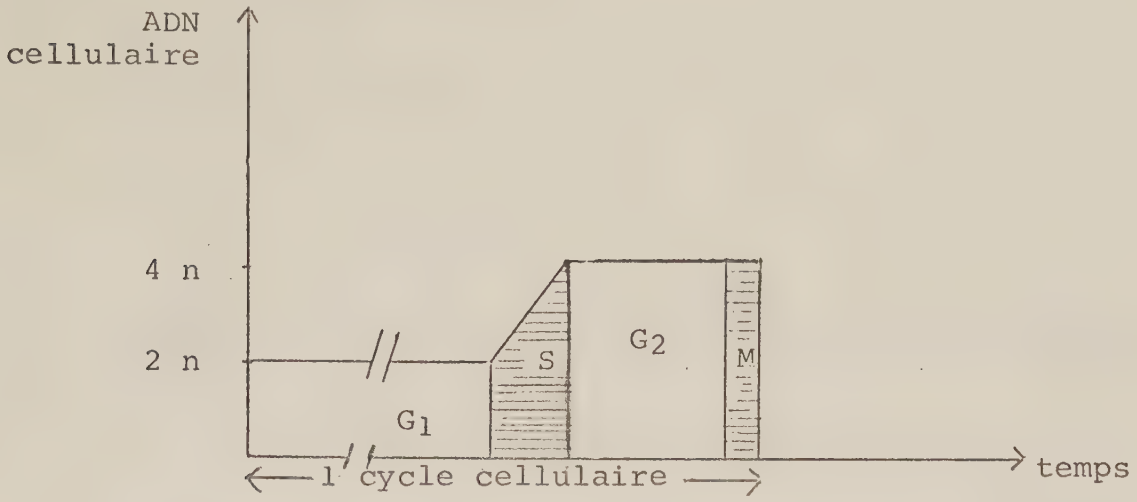


Figure 1 : Modèle du cycle cellulaire selon Howard et Pelc.

Phase G_1 : le noyau de la cellule est au repos.

Phase S : la synthèse d'ADN se produit.

Phase G_2 : le noyau est de nouveau au repos mais la quantité d'ADN par rapport à G_1 a doublé.

Phase M : c'est le temps durant lequel s'effectue la mitose.

Smith et Martin (2) ont suggéré une séquence de deux états pour définir le cycle cellulaire (fig. 2) :

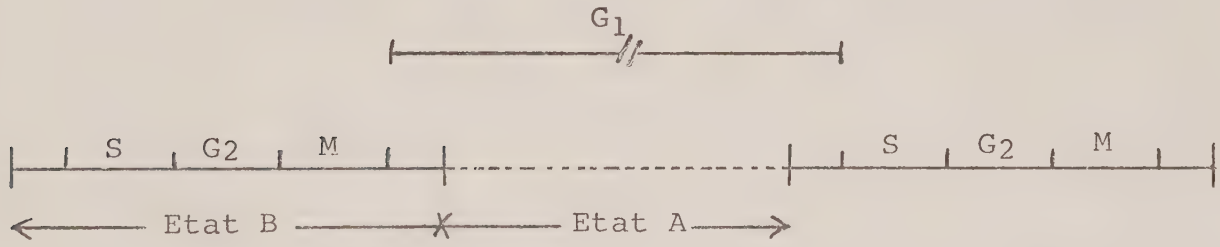


Figure 2 : Modèle du cycle cellulaire selon Smith et Martin.

L'état A correspond à la phase fonctionnelle de la cellule : cet état a une durée indéterminée. L'état B correspond à une séquence d'évènements se terminant après la division cellulaire.

.../...

Bullough (3) a proposé un modèle plus détaillé (fig. 3) :

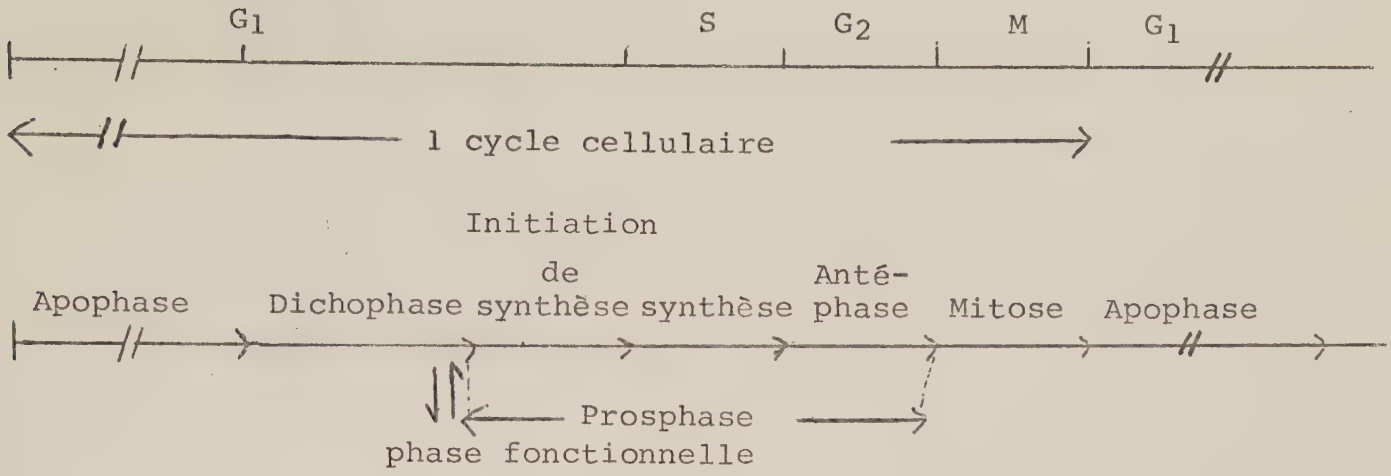


Figure 3 : Modèle du cycle cellulaire selon Bullough.

L'apophase décrit la période où la cellule a terminé sa division et effectue sa croissance.

La dichophase est le moment où la cellule va soit s'engager sur une phase fonctionnelle, soit au contraire s'engager sur sur le chemin de la mitose.

La phosphase est la période durant laquelle la cellule réalise toutes les synthèses pour effectuer la mitose.

Ainsi, l'initiation de la prosphase voit la fabrication des enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN en phase de synthèse.

L'étape qui sépare la phase de synthèse de la mitose est l'antéphase. Went (4) a suggéré que certaines synthèses ont lieu durant cette phase, notamment la production des molécules qui permettront de former l'appareil fuseaurial.

Enfin, la mitose consacre la division cellulaire par le partage du matériel cytoplasmique et nucléique entre deux cellules filles.

La suite des évènements qui définissent le cycle cellulaire et sa régulation est mal connue actuellement. D'après les différentes études menées jusqu'alors, on constate en général que :

1. La phase G_1, l'état A ou plus précisément l'apophase serait de durée indéterminée.

2. Par contre, la durée totale des phases S + G_2 + M serait constante pour un tissu d'une espèce donnée et d'un âge donné (5),(6),(7).

.../...

De telles informations peuvent suggérer que la régulation de la vitesse du renouvellement cellulaire dans chaque tissu se fait par allongement ou raccourcissement de la phase G_1. C'est pourquoi, une telle régulation ferait partie des propriétés spécifiques d'un tissu, acquises lors de la différentiation cellulaire (5).

Killander et Zetterberg (8) ont montré que la durée de G_1 est dépendante de la masse cellulaire : plus la masse est importante au début de G_1, plus la phase G_1 est courte. Ainsi, un long arrêt en G_1 entraîne une détérioration des conditions métaboliques nécessaires à une reproduction cellulaire continue : l'initiation de synthèse sera plus longue car il faut alors recréer la machine métabolique permettant la réplication de l'ADN.

Les cellules qui ont cessé de se diviser (soit réversiblement mais pour un temps très long, soit définitivement comme par exemple les neurones et les cellules de muscle strié) s'arrêtent au stade G_1 pour la majorité d'entre elles, ou en G_2 pour quelques autres. Cet arrêt peut être dû :

1. à des causes non spécifiques dans l'environnement cellulaire.

2. à des facteurs plus spécifiques comme une inhibition de contact mise en évidence dans le cas des cultures de cellules de mammifères (9).

3. à des agents caractéristiques du tissu, que l'on pense être présents dans l'environnement immédiat de chaque tissu en renouvellement chez les organismes multicellulaires.

Il a été montré que des cellules peuvent se multiplier sans phase G_1 mesurable dans certaines conditions et présenter une phase G_1 dans d'autres conditions (10),(11) ; cependant, même en l'absence d'une période G_1 mesurable, les évènements qui initient la synthèse d'ADN sont toujours présents entre la mitose et la phase de synthèse ; ils doivent donc raisonnablement être dénommés "évènements de G_1".

Par ailleurs, Gelfant (12),(13) a découvert que chez la souris, des cellules du rein et du duodénum (14) demeurent normalement au stade G_2 pendant plus de vingt heures ; ces cellules conservent la possibilité de se diviser.

La régulation du cycle cellulaire semblerait donc s'opérer en G_1 ou en G_2 : ce sont les deux seules phases du cycle où la cellule demeure pendant un temps assez long. Les autres phases, une fois abordées, semblent devoir irrémédiablement se dérouler sans arrêt d'aucune sorte. Or les phases G_1 et G_2 sont les phases du cycle où se produisent des synthèses protéiques. On peut se demander si la régulation se produit sous l'action d'effecteurs de certaines de ces synthèses.

.../...

B) Quelques hypothèses sur l'existence d'effecteurs naturels du cycle cellulaire

Le fait qu'une cellule reste longtemps en G_1 ou en G_2 pose les problèmes suivants : est-ce un effecteur qui bloque la cellule à l'un de ces stades ou bien qui intervient pour stimuler la division cellulaire et faire évoluer la cellule de la phase G_1 ou G_2 vers, respectivement, la phase S ou M ?

Selon Szent-Györgyi (15), il y aurait deux substances antagonistes, un activateur ("promine") et un inhibiteur ("retine"), qui réguleraient des réactions d'oxydo-réduction du métabolisme ; cependant, la relation proposée entre les réactions d'oxydo-réduction et la division cellulaire reste très vague et ne repose actuellement sur aucune base expérimentale.

Dans le modèle de Smith et Martin (16),(2), les auteurs supposent que le passage de l'état A à l'état B (autrement dit de G_1 à S) est un évènement aléatoire, comme la désintégration radioactive avec un temps de demi-vie défini par une "probabilité de transition". Il existerait alors un initiateur de l'état B dont la concentration serait variable dans la cellule ; lorsqu'un seuil de concentration serait atteint, la probabilité de transition augmenterait, favorisant ainsi le passage de l'état A vers l'état B.

En 1957, Weiss et Kavanau proposent un modèle cybernétique qui rend compte des observations sur la croissance des tissus : chaque cellule fabrique un inhibiteur spécifique de sa propre croissance, qui diffuse librement dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la croissance est régulée par une rétroaction négative ; si des cellules disparaissent, la production d'inhibiteurs baisse et sa concentration dans le milieu extracellulaire aussi, ce qui permet aux cellules de se diviser.

Déjà, en 1936, Simms et Stillman (18) décrivaient un inhibiteur de la croissance cellulaire, présent dans un extrait de cellules de l'aorte.

Bullough et Lawrence (19),(20),(21), montrent que l'épiderme normal contient une substance spécifique du tissu et inhibitrice des mitoses ; la concentration de l'inhibiteur diminue au voisinage d'une lésion, permettant l'accroissement de l'activité mitotique ; l'inhibiteur est probablement synthétisé dans l'épiderme et il n'est pas cytotoxique ; cette substance est inactive sur les autres tissus mais agit sur le même tissu d'autres espèces. Cet inhibiteur est labile et est véhiculé par le sang.

Ces travaux ont été confirmés par Iversen et ses collaborateurs (22),(23) et d'autres équipes (24),(25),(26).

.../...

En 1962, Bullough baptise cette substance du terme de "chalone" (27), en la définissant comme étant "une secrétion interne produite par un tissu dans le but de contrôler par une inhibition, l'activité mitotique des cellules de ce même tissu".

D'après la théorie de Bullough, une chalone serait une substance qui présenterait :

1. une spécificité tissulaire,
2. une absence de spécificité d'espèce,
3. une réversibilité d'action,

et qui serait :

4. labile et éliminable dans l'organisme qui la produit.

Depuis, des régulateurs du genre "chalone" ont été recherchés dans les principaux tissus où l'on suppose un contrôle de la division cellulaire. Une telle présence semble avoir été mise en évidence dans les tissus suivants :

TABLEAU 01

CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES CHALONES

Chalone	Activité par bloquage en phase	Poids moléculaire (daltons)	Références
Epidermique	G_1 , G_2	G_1 = 30.000-40.000 G_2 = > 100.000	(20), (28) (29)
Mélanocytaire	G_1	< 2.000	(30), (31)
Fibroblastique	G_1	30.000-50.000	(32)
Rénale	G_1	-	(33), (34)
Granulocytaire	G_1	< 5.000	(35), (36), (37)
Lymphocytaire	G_1 , G_2	G_1 = 30.000-50.000 G_2 = -	(38), (39), (40) (40)
Hépatique	G_1 , G_2	G_1 = < 2.000 G_2 = -	(41), (42), (43) (44)

.../...

Depuis ces travaux préliminaires, d'autres travaux publiés ont confirmé ces résultats ; des revues récentes ont fait le point sur ce sujet (45) ,(46).

Nous nous sommes intéressés à l'existence éventuelle d'inhibiteurs du type "chalone" dans le tissu hépatique, car la biologie de ce tissu suppose un mécanisme de régulation où interviendraient des inhibiteurs de la division cellulaire.

II - PRESENCE D'INHIBITEURS DE LA DIVISION CELLULAIRE DANS LE FOIE

Dans le foie adulte, le nombre des divisions cellulaires est très faible. Si, chez le rat, les deux tiers du foie sont enlevés, les cellules hépatiques du tiers restant se divisent immédiatement et activement pour régénérer un organe de poids normal en environ sept jours. Il faut donc supposer :

1. que les cellules hépatiques qui restaient sont "informées" du déficit cellulaire postopératoire.

2. que cette "information" se traduit, en autres conséquences, par la multiplication massive de cellules précédemment au repos.

3. que les cellules sont "informées" de l'achèvement de la régénération tissulaire puisqu'elles arrêtent alors de se diviser.

Un mécanisme de régulation doit donc exister, qui permet d'harmoniser la multiplication cellulaire avec les besoins du moment.

En 1956, Saetren (41) trouve qu'un extrait de foie normal adulte inhibe la mitose des hépatocytes d'un foie partiellement hépatectomisé. Cet extrait semble inactif vis-à-vis d'un rein de rat partiellement néphrectomisé. Un inhibiteur agissant sur le foie va dès lors être recherché.

L'action inhibitrice des extraits de foie va être confirmée par Henderson sur le foie de rat (47), Frayssinet et Chany sur des cultures de cellules cancéreuses (48),(49).

Puis, Verly et ses collaborateurs (42) semblent trouver dans l'extrait de foie de lapin une substance douée d'une activité de type "chalone" *in vitro* puis *in vivo*. Ils constatent alors que cette "chalone hépatique" agirait sur la transition $G_1 \longrightarrow S$, en empêchant la synthèse d'ADN, cependant ils trouvent aussi dans l'extrait des inhibiteurs non spécifiques du tissu hépatique (43).

Par contre, Spielhoff (50) montre que l'extrait de foie, bien qu'il soit inhibiteur de la division des hépatocytes chez le bébé rat ne présente pas de spécificité de tissu *in vitro* et *in vivo*. Cette absence de spécificité *in vitro* et *in vivo* est confirmée par Wayss, Mattern et Volm (51),(52) qui en concluent par ailleurs qu'une substance du type "chalone" ne peut être obtenue dans leurs conditions d'extraction dans le foie.

.../...

Il semble donc qu'actuellement les travaux publiés sur le foie soient contradictoires quant à la mise en évidence d'une chalone hépatique. Cependant, il convient de remarquer que des résultats différents ont été obtenus avec des tests biologiques différents et des extraits de foie préparés dans des conditions qui ne sont pas identiques.

Dans le but d'éluder ces contradictions, nous nous sommes proposés de reprendre l'étude de ce problème ; ce travail nous a conduit :

1. à définir un test biologique avec la recherche d'un matériel biologique adéquat et d'une méthode simple et précise pour mesurer l'action d'un extrait de foie sur la division cellulaire.

2. grâce à ce test, à étudier l'activité biologique d'un extrait de foie.

- CHAPITRE I -

Mise au point d'une méthode permettant de mesurer l'activité biologique d'un extrait de foie

I - LES PROBLEMES

A) Le choix d'un test biologique

Dans la littérature, un certain nombre de tests biologiques ont été mis au point et utilisés pour la mise en évidence d'inhibiteurs de la division cellulaire hépatique ; on distingue notamment :

1. Des test "in vitro"

   a) Etude de la division cellulaire de tranches de foie en survie (42).

   b) Etude de la division d'hépatocytes en culture cellulaire (48),(53),(54).

2. Des test "in vivo"

   a) Etude de la division des hépatocytes chez le rat partiellement hépatectomisé (55).

   b) Etude de la division des hépatocytes chez des rats de 10 jours après stimulation de celle-ci par l'injection intradermique d'une solution de caséine (56).

Nous avons étudié et comparé ces méthodes : nous avons remarqué que parmi les deux techniques "in vitro", la survie des tranches de foie est réduite à trois heures, tandis que la culture cellulaire d'hépatocytes peut avoir lieu durant un ou deux cycles cellulaires ce qui permet ainsi de mettre en évidence d'éventuels effecteurs agissant soit en G_1, soit en G_2.

D'autre part, cette dernière technique permet une plus grande reproductibilité et le traitement d'un nombre plus grand d'échantillons.

Entre les deux tests "in vivo", le second présente l'avantage de travailler sur des animaux de faible taille ce qui nécessite des quantités de substance à tester relativement plus faibles par rapport à celles nécessaires aux expériences effectuées sur des rats adultes partiellement hépatectomisés. Cependant, ce test "in vivo" se prête mal à des mesures en série compte-tenu du nombre même d'animaux à traiter pour obtenir un résultat significatif.

.../...

C'est pourquoi la culture d'hépatocytes et la "stimulation à la caséine" d'hépatocytes "in vivo" se sont révélées les plus aptes comme tests rapides, maniables et reproductibles.

Dans tous les cas, il a fallu trouver une méthode pour mesurer la division cellulaire. Nous avons choisi pour cela de suivre l'incorporation de la 3H-Thymidine dans l'ADN des hépatocytes.

B) L'incorporation de la ^{3}H - Thymidine dans l'ADN des hépatocytes

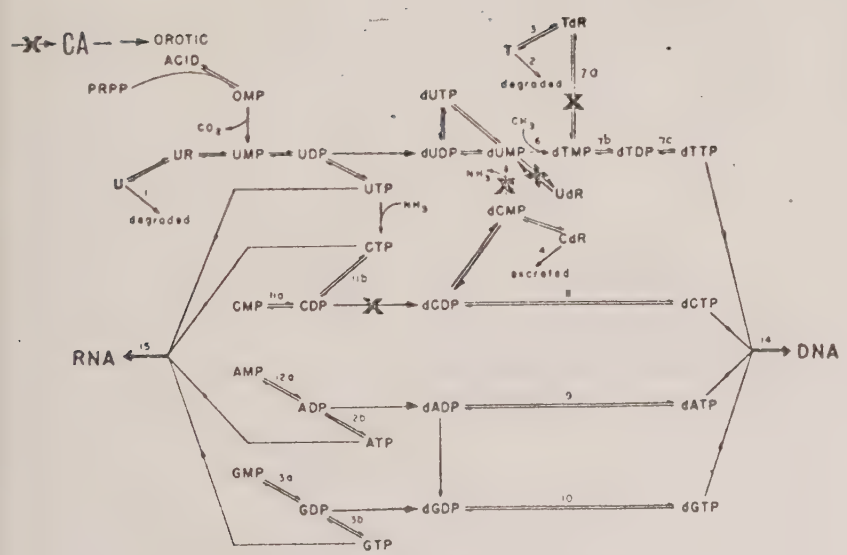
Dans une cellule, durant la phase S, l'ADN du noyau est en réplication c'est-à-dire qu'il y a synthèse de deux brins d'ADN complémentaires aux deux brins initiaux qui servent de matrice. Si un précurseur marqué de l'ADN est présent à ce moment-là, l'ADN en réplication va incorporer le produit marqué. La quantité de marqueur incorporée pendant un temps donné va refléter le taux de réplication : pour cela, on définit l'activité spécifique de l'ADN comme étant le marquage mesuré par unité d'ADN.

L'utilisation de l'activité spécifique de l'ADN marqué peut alors être un moyen de voir si un produit testé bloque les cellules en phase G_1 ou pas. Mais au cas où un produit bloque la division après la phase S, cette méthode ne montrera rien si le marquage est fait sur une durée inférieure à un cycle cellulaire.

Un des précurseurs radioactifs de choix pour une telle étude est la ^{3}H (méthyl) thymidine car c'est le nucléoside qui est sélectivement incorporé dans l'ADN.

Figure 1.1

(reproduced from BUCHER 1963, with the addition of the steps from CA to orotic acid, Udr to dUMP, and the sites of feedback inhibition by TTP which act on the anabolic steps.)



The general pathways leading to DNA and RNA synthesis. Double arrows indicate that one compound can be reversibly transformed into another but not necessarily by the same reaction, since in most cases different enzymes are involved in anabolic and catabolic steps. It is not certain at what levels of phosphorylation some of these reactions occur. The sites of inhibition by TTP (X) are also shown. CA represents carbamyl aspartic acid which leads to orotic acid by a number of steps. The numbers locate the following steps:

(1) degradative pathway for uracil
(2) degradative pathway for thymine
(3) thymidine phosphorylase
(4) elimination of deoxycytidine by excretion rather than degradation
(5) deoxycytidylate deaminase
(6) thymidylate synthetase
(7a) thymidine kinase
(7b) thymidine monophosphate kinase
(7c) thymidine diphosphate kinase
(8) deoxycytidylate kinase
(9) deoxyadenylate kinase
(10) deoxyguanylate kinase
(11a and b) cytidylate kinase
(12a and b) adenylate kinase
(13a and b) guanylate kinase
(14) DNA polymerase
(15) RNA polymerase

La thymidine pénètre dans la cellule en étant transformée en déoxythymidine monophosphate (dTMP). Bien que la thymidine ne soit pas essentielle pour la synthèse de l'ADN – sauf quelques exceptions – elle est rapidement incorporée dans l'ADN de la plupart des organismes (fig. 1.1).

Par contre, la thymine est nettement moins bien incorporée que la thymidine puisque son incorporation dans l'ADN de la plupart des tissus de mammifères représente moins de 4 % de celle de la thymidine (57),(58) . La thymidine subit une série de phosphorylations menant à la thymidine triphosphate, forme sous laquelle elle est incorporée avec libération de pyrophosphate (fig. 1.2).

Figure 1.2

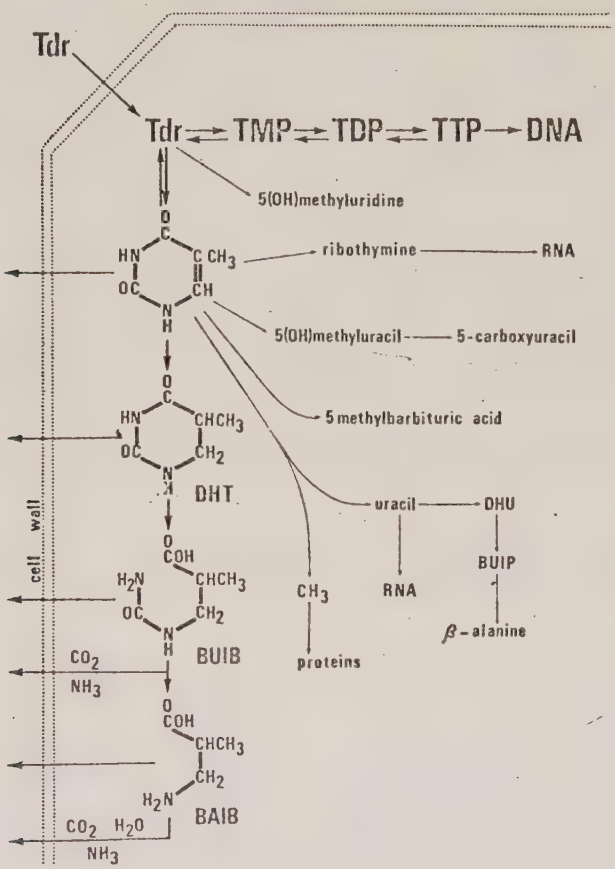


Fig. 2.2. Pathways of incorporation and degradation of thymidine. Major degradation pathway is via reduction to dihydrothymine (DHT), β-ureidoisobutyric acid (BUIB), β-aminoisobutyric acid (BAIB), and CO_2, NH_3 and H_2O. Minor pathways are included on the basis of at least one publication but may not be equally prevalent in all organisms.

.../...

Cependant, il peut y avoir deux raisons pour lesquelles on doit utiliser cette méthode avec précaution lorsqu'on désire tester l'activité d'un extrait tissulaire.

En premier lieu, de nombreux tissus contiennent des enzymes tels que la thymidine phosphorylase et la thymidine hydrolase qui peuvent modifier ou dégrader la thymidine radioactive et par là, empêcher son incorporation.

Il faut rappeler que le foie possède une activité thymidine hydrolase non négligeable. Cependant, une dialyse d'un extrait contre de l'eau aboutit à la disparition de cette activité enzymatique.

La deuxième raison est la présence dans l'extrait à tester de nucléosides non radioactifs, notamment de la thymidine. Cette dernière présente dans un extrait à tester, diluera la thymidine marquée en abaissant la teneur en précurseur radioactif par rapport au précurseur non marqué. Ainsi, une probabilité plus faible d'incorporer une molécule marquée risque de s'interpréter comme une inhibition apparente de l'incorporation de ^{3}H-Thymidine et par là, de l'entrée des cellules en phase S.

Dans ce cas, la dialyse de l'extrait contre de l'eau peut se réveler inefficace si la fraction active est constituée de molécules dialysables. D'autre part, de nombreuses protéines peuvent fixer non spécifiquement de la thymidine ce qui non seulement donne un matériel précipitable à l'acide trichloracétique, enrichi en thymidine, mais encore appauvrit la teneur en thymidine marquée disponible pour être incorporée dans l'ADN.

C'est pourquoi, il a fallu tenir compte de ces différentes remarques pour pouvoir doser l'activité spécifique de l'ADN dans le foie.

C) Dosage de l'activité spécifique dans le foie

La détermination du taux de synthèse de l'ADN "in vivo" et "in vitro" dans les tissus de mammifères, a été très souvent effectuée par la mesure de l'incorporation de la ^{3}H - thymidine dans les fractions acido-insolubles des tissus, directement ou après délipidation et hydrolyse acide de l'ADN, selon les protocoles décrits par Schmidt et Thannhauser (59) et par Schneider (60),(61).

Récemment, Morley et Kingdon (62) ont mesuré l'incorporation "in vitro" de la ^{3}H - thymidine dans des hépatocytes isolés selon Thomas (63) . Les résultats expérimentaux qu'ils obtiennent semblent démontrer que, dans le cas de ces cellules, ces méthodes ne peuvent être utilisées avec sureté pour la détermination du taux de synthèse de l'ADN : l'hydrolyse en milieu acide entraînait, d'après eux, la libération d'une quantité importante de radioactivité non associée à l'acide désoxyribonucléique. Ces auteurs préconisent l'extraction de l'ADN par le phénol avant d'évaluer la radioactivité incorporée. Par contre, Goldspink et Goldberg (64) concluent peu après que la précipitation en milieu acide de l'ADN

.../...

selon la méthode de Schneider et Greco (61) permet de mesurer correctement et spécifiquement le taux de synthèse de l'ADN sur des tranches de tissu de mammifères "in vitro".

Ces contradictions rencontrées dans la littérature nous ont amenés à réévaluer les différentes méthodes d'extraction proposées.

II - MATERIEL ET METHODES

A) Matériel

Les rats de souche Spragne-Dawley proviennent de l'élévage IFFA-CREDO.

La thymidine est un produit Merck.

La thymidine tritiée est fournie par le CEA (Saclay). Elle a une activité spécifique de 5 mCi/mmole pour l'expérimentation "in vivo" et de 25 mCi/mmole pour les expériences "in vitro". La pureté radiochimique du produit a été contrôlée par chromatographie sur plaque de cellulose dans les systèmes de solvants préconisés par le CEA.

Solvants préconisés :

1. Butanol, acide acétique, eau (50 : 25 : 25).
2. Acétate d'éthyle, acide formique, eau (60 : 5 : 35).
3. Acide isobutyrique, eau, toluène, EDTA (0,1 M), ammoniaque (80 : 11 : 10 : 1,5 : 0,5).

Les cultures sont faites dans des boites en plastique Nunclon de 60 mm de diamètre. Le milieu NCTC 109 est fourni par Eurobio et le milieu F_{12} de Ham est confectionné au laboratoire à partir de solutions stocks de produits Merck, Calbiochem et Sigma.

Le dosage des protéines est effectué selon Lowry (65), celui de l'ADN selon Burton (66) en prenant comme étalon respectivement de l'albumine de sérum de boeuf (Miles) ou de l'ADN de thymus de veau (Krishell).

l'ADN est dosé par la méthode de Mejbaum (67) en utilisant de l'orcinol (Merck) et comme étalon du ribose (Pfanstiehl).

La radioactivité est mesurée pour chacun des échantillons sur des fractions de 0,3 ml dans 10 ml de liquide scintillant (68) à l'aide d'un compteur à scintillation Nuclear Chicago Mark I. L'appareil a été étalonné avec différentes courbes de correction d'affaiblissement lumineux, afin d'évaluer les rendements de comptage lors de chaque mesure. Le temps de comptage a toujours été suffisamment long pour avoir une estimation avec une erreur inférieure ou égale à 6 %.

B) Stimulation de la division cellulaire des hépatocytes "in vivo" chez les jeunes rats

Des rats de 20 grammes (10 jours), d'une même portée, reçoivent au temps 0 une injection sous-cutanée de 0,4 ml d'une solution de caséine à trois pour mille, selon la méthode de Nadal (56).

Ce traitement induit l'entrée synchrone dans la phase S du cycle cellulaire d'une partie des hépatocytes.

Puis après 17 heures, une injection intrapéritonéale de ^3H - thymidine est faite à raison de 20 µl par individu ; une heure après, l'animal est sacrifié, le foie est prélevé et broyé au potter dans une solution de saccharose

0,32 M, Mg Cl_2 3.10^{-3}M à 0-4°C. Le broyat est filtré sur gaze.

L'extraction des acides nucléiques et les dosages sont effectués à partir de 0,3 ml d'homogénat ainsi obtenu.

C) Cultures primaires d'hépatocytes de rat foetal (53),(54)

La mise en culture des hépatocytes est effectuée à partir d'embryons de 18 jours (0,8 à 0,9 foie d'embryon par boite) dans 4 ml d'un mélange à parties égales de milieu F_{12} de Ham et de milieu NCTC 109 contenant 7,5 % de sérum de veau foetal décomplémenté : les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air à 6 % de CO_2.

Le milieu est renouvelé 24 heures après la mise en culture. Les cellules sont incubées pendant deux heures en présence de ^{3}H-thymidine (1,4 µCi/ml) à partir de la 40ème heure. L'activité spécifique de la ^{3}H-thymidine dans le milieu est alors de 63 µCi/mmole.

Après incubation, les cellules de deux boites de culture sont rincées 3 fois avec 4 ml par boîte d'une solution de "Saline G" sans Ca^{++} ni Mg^{++} contenant 0,1°/$_{oo}$ de thymidine; elles sont réunies, après avoir été décollées à 37°C par 2 ml par boîte d'une solution de Saline G sans Ca^{++} ni Mg^{++} contenant de l'EDTA à 0,1 %, puis traitées.

D) Protocoles comparés d'extraction des acides nucléiques

1. Précipitation à l'acide trichloracétique selon Schneider (60)

Les précipitations et lavages sont réalisés à 0-4°C.

Le matériel biologique est lavé 3 fois avec 2 ml d'acide trichloracétique à 5 %. Les eaux de lavage contiennent la fraction acido-soluble. La fraction acido-insoluble délipidée par 3 rinçages de 2,5 ml à l'alcool 95°; puis les acides nucléiques sont retirés de la fraction acido-insoluble par deux hydrolyses successives à l'acide trichloracétique à 5% (2 fois 1 ml) pendant 15 mn à 90°C. On dose dans l'hydrolysat les désoxyribonucléosides provenant de l'ADN par la méthode de Burton.

2. Précipitation à l'acide perchlorique selon la méthode de Schneider et Greco (60) modifiée par Goldspink et Goldberg (61)

Les précipitations et les lavages sont réalisés à 0-4°C.

La fraction acido-soluble est obtenue par 3 lavages successifs de 3 ml du matériel biologique à l'acide perchlorique 0,2 M. La fraction lipidique est extraite de la phase acido-insoluble – ramenée à pH 7 à l'aide d'ammoniaque – par 3 lavages de 3 ml à l'alcool 95°. L'ARN est alors extrait par hydrolyse de la fraction acido-insoluble pendant 1 heure à 37°C dans de la soude 0,5 M (1 ml), puis par deux lavages de 1 ml à l'acide perchlorique 0,6 M et 0,3 M. L'ADN est hydrolysé deux fois en incubant pendant vingt minutes à 70°C le résidu solide dans 1 ml d'une solution d'acide perchlorique 1 M. A partir du reliquat, les protéines sont hydrolysées dans 1 ml de soude 0,5 M pendant 5 mn au bain-marie bouillant.

.../...

3. Extraction par une solution phénolique puis précipitation à l'éthanol selon Koch et Stockstad (69)

Le matériel biologique est laissé 10 heures en présence de tampon TRIS/HCl 10^{-2}M (pH8), EDTA 10^{-3}M, NaCl 10^{-1}M contenant 1 % de dodécylsulfate de sodium. On ajoute alors un ml de tampon saturé en phénol et contenant 1% de mercaptoéthanol. Après agitation, le surnageant est extrait 2 fois, puis lavé à l'éther. Les acides nucléiques sont précipités au froid par 2 ml d'alcool glacé à 95° en présence d'acétate de sodium 3.10^{-2}M.

Le précipité est hydrolysé par de l'acide trichloracétique à 5% pendant 15 minutes à 90°C.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A) Cinétique d'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal

Lors de l'ensemencement, la population cellulaire des hépatocytes est hétérogène par rapport au cycle cellulaire.

Il faut donc savoir :

1. Si l'incorporation de la ^{3}H-thymidine se fera d'une façon synchrône pour au moins une partie de la population.

2. Les conditions optimales de cette incorporation.

Ainsi, 24 heures après la mise en culture, nous avons effectué des marquages de 5 heures ou de 3 heures avec de la thymidine tritiée, ceci jusqu'à la 58ème heure. Puis, nous avons extrait et dosé l'activité spécifique de l'ADN par la méthode à l'acide perchlorique (tableau 1.2).

.../...

Figure 1.3.

Cinétique d'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat fœtal en culture

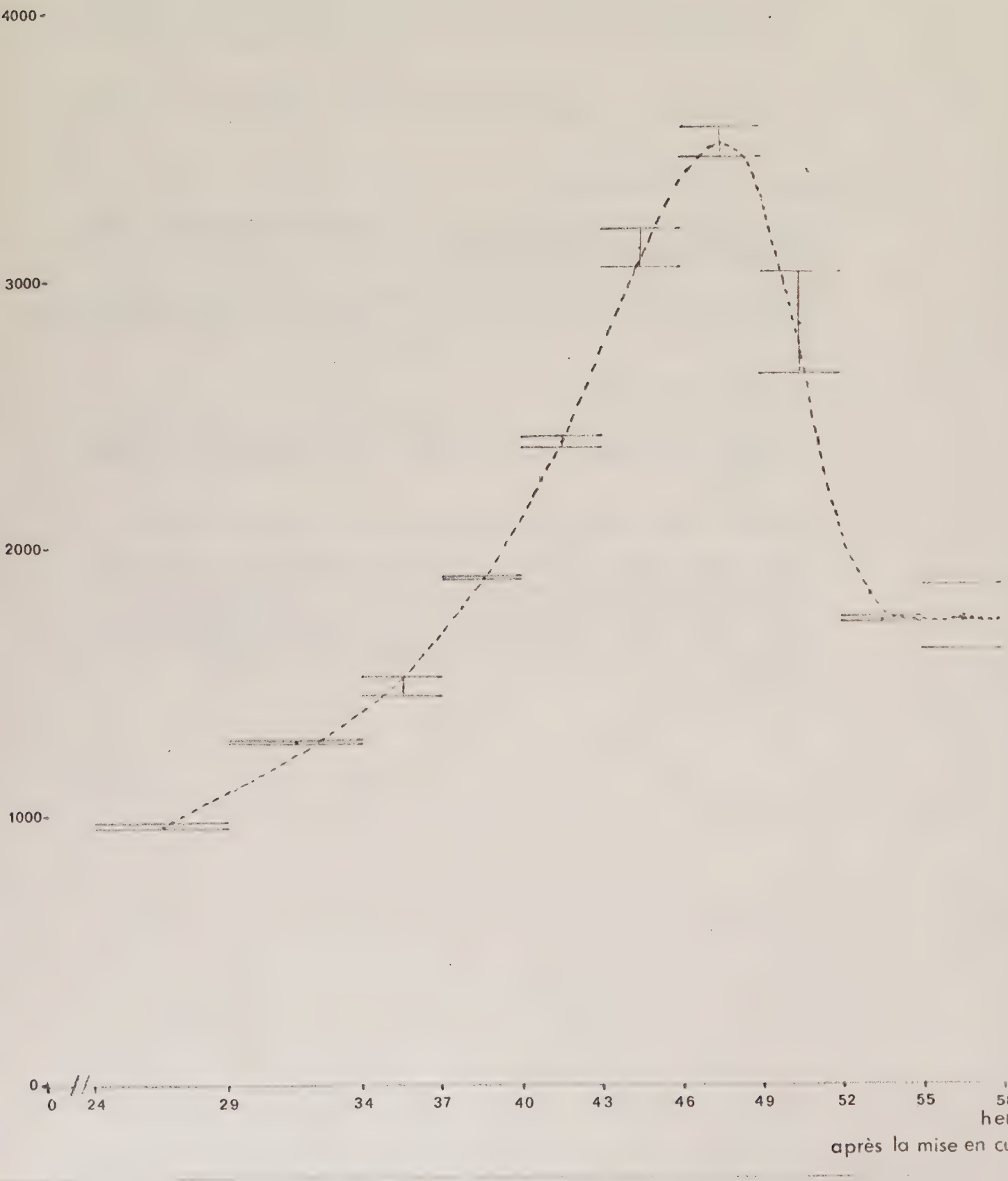


TABLEAU 1.2.

Cinétique d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal "in vitro"

temps de marquage après la mise en culture	dpm pour 2 boites	µg d'ADN pour 2 boites	Activité spécifique de l'ADN : $\frac{dpm}{\mu g\ ADN}$	
24 h - 29 h	15.270	9.3	1640	980 ⊠
	19.750	12.4	1600	950 ⊠
29 h - 34 h	22.470	10.5	2140	1280 ⊠
	30.660	14.2	2160	1300 ⊠
34 h - 37 h	17.870	11.7	1530	
	13.620	9.3	1460	
37 h - 40 h	21.250	11.2	1900	
	22.200	11.7	1900	
40 h - 43 h	36.800	15.2	2420	
	30.070	12.6	2390	
43 h - 46 h	48.600	15.9	3060	
	55.200	17.3	3190	
46 h - 49 h	43.300	12.6	3440	
	40.530	11.7	3460	
49 h - 52 h	40.400	13.3	3040	
	31.070	11.7	2660	
52 h - 55 h	32.360	18.7	1730	
	37.270	21.3	1760	
55 h - 58 h	34.870	18.7	1860	
	33.070	20.3	1630	

⊠ Activité spécifique ramenée à 3 heures de marquage

En portant les activités spécifiques de l'ADN pour 3 heures de marquage en fonction du temps, nous obtenons une courbe (fig. 1.3) qui nous montre que l'incorporation optimale de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN se situe entre la 40ème et la 50ème heure après la mise en culture. Il semble donc qu'une partie de la population cellulaire incorpore de façon synchrône le précurseur marqué.

.../...

B) Comparaison de différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques

Nous avons comparé 3 méthodes d'extraction en déterminant la répartition de la radioactivité entre les différentes fractions obtenues après incorporation de la ^{3}H-thymidine. Cette comparaison porte sur des cultures d'hépatocytes de rat foetal ("in vitro") et sur des foies de jeunes rats dont les mitoses hépatiques sont stimulées par injection de caséine ("in vivo").

L'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN a été étudiée "in vitro" entre la 40ème et la 42ème heure. Après les lavages, les hépatocytes ont été traités à l'acide perchlorique et le fractionnement effectué selon le protocole décrit par Goldspink et Goldberg
Les résultats obtenus (tableau 1.3) montrent que 70 p. cent de la radioactivité présente dans la partie acido-insoluble est associée à l'ADN ; le reste est réparti entre les lipides (15 p. cent), l'ARN (6 p. cent) et les protéines (9 p. cent).

L'absence de radioactivité dans ces différentes fractions, lorsque les cellules sont placées à 4°C en présence du précurseur radioactif, tend à prouver que les conditions expérimentales utilisées ne conduisent pas à l'entraînement non spécifique de ^{3}H-thymidine par les fractions extraites, contrairement aux résultats présentés dans les travaux antérieurs (62).

TABLEAU 1.3

Radioactivité dans les fractions d'hépatocytes de rat foetal en culture incubés en présence de ^{3}H-tymidine (extraction perchlorique)

Incubation 2 heures à 4°C		Incubation 2 heures à 37°C	
Radioactivité en dpm (moyenne de deux boîtes)		Radioactivité en dpm (moyenne de deux boîtes)	Pourcentage de la radioactivité dans la fraction acido-insoluble
action	1680	2520	
ido - soluble	1570	3750	
action ido-insoluble:			
pides	90 (%)	3290	15
	100 (%)	4350	
N	80 (%)	1190	6
	80 (%)	1700	
N	70 (%)	16500	70
	80 (%)	18410	
otéines	90 (%)	1990	9
	100 (%)	2600	

La radioactivité mesurée ne présente pas de différences significatives par rapport au bruit de fond (100 dpm).

.../...

L'expérimentation "in vivo" a été conduite en double sur trois séries d'animaux. Les résultats obtenus après le fractionnement du foie des animaux traités indiquent (tableau 1.4) que plus de 70 p. cent de la radioactivité de la fraction acido-insoluble est associée à l'ADN.

TABLEAU 1.4

Radioactivité dans les fractions de foie de rat après injection de ^{3}H-thymidine in vivo (extraction perchlorique)

Fraction étudiée	Radioactivité en dpm	Pourcentage de la radioactivité dans la fraction acido-insoluble
	SERIE 1	
Fraction acido-soluble	143400 148800	
Fraction acido-insoluble:		
lipides	2020 1920	5
ARN	3860 3400	10
ADN	26900 24500	71
protéines	5100 4700	14
	SERIE 2	
Fraction acido-soluble	150200 134100	
Fraction acido-insoluble		
lipides	2200 2220	5
ARN	3710 3350	8
ADN	31900 29900	76
protéines	4240 4250	11
	SERIE 3	
Fraction acido-soluble	128700 108400	
Fraction acido-insoluble		
lipides	2120 2560	5
ARN	3330 1900	6
ADN	34900 30700	74
protéines	6750 5750	15

Ce taux se retrouve de façon reproductible dans les animaux traités indépendamment de leur variabilité individuelle. Il en est de même du pourcentage de la radioactivité mesurée dans les lipides, l'ARN et les protéines. D'autre part, la valeur de la radioactivité extraite dans la phase acido-soluble diffère dans les expériences "in vitro" et "in vivo". Pour les hépatocytes en culture, l'activité associée à cette partie représente 17 p. cent de celle libérée par hydrolyse de l'ADN ; elle est 4 à 5 fois supérieure à cette dernière dans les expériences "in vivo". Cette différence pourrait s'expliquer par la présence dans les foies prélevés d'un compartiment extra-cellulaire important relativement riche en ^{3}H-thymidine au moment de sacrifier les animaux. Par ailleurs, la période de temps qui sépare l'injection du précurseur radioactif du sacrifice des animaux est peut-être insuffisante pour permettre une incorporation optimale de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN hépatique (65).

Pour les deux types d'expériences examinés, la plus grande partie de la radioactivité associée à la phase acido-insoluble (70 p. cent) semble donc liée à de l'ADN.

Afin de préciser si la radioactivité libérée lors de l'hydrolyse acide est contaminée ou non par la présence d'une radioactivité non spécifique liée aux protéines, nous avons comparé pour des échantillons identiques les produits d'hydrolyse de l'ADN isolé des tissus par extraction au phénol et ceux obtenus par hydrólyse acide de la fraction acido-soluble : dans ce dernier cas, nous avons comparé les deux techniques les plus utilisées d'après la littérature : celle à l'acide trichloracétique (60) et celle à l'acide perchlorique (61) .

Les résultats présentés (tableau 1.5) sont obtenus à partir de trois séries d'expériences d'incorporation "in vivo" sur les rats et une série sur les hépatocytes en culture, chaque détermination étant effectuée en double.

.../...

TABLEAU 1.5

Comparaison de trois méthodes d'extraction de l'ADN d'hépatocytes ayant incorporé de la ^{3}H-thymidine in vivo et in vitro

	Extraction par précipitation à l'acide trichloracétique				Extraction par précipitation à l'acide perchlorique				Extraction par la méthode au phénol			
	Numéro de l'expérience											
	1 in vivo	2 in vivo	3 in vivo	4 in vitro	1 in vivo	2 in vivo	3 in vivo	4 in vitro	1 in vivo	2 in vivo	3 in vivo	4 in vitr
µg d'ADN	189	207	218	80	193	183	196	51	138	174	186	33
	198	192	218	55	173	166	174	52	105	174	193	28
Radioactivité en dpm	28600	36900	39500	24000	26900	31900	34900	16600	19700	39000	45000	10900
	30100	34500	39300	16600	24500	29900	30700	18400	15100	41000	50900	10200
Activité spécifique en dpm/µg d'ADN	151	178	181	302	139	174	177	324	142	223	241	344
	152	180	179	302	141	179	176	352	142	236	263	364

Ces trois méthodes d'évaluation de l'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN de foie de rat conduisent à des conclusions différentes de celles qui sont publiées : Morley et Kingdon ont montré que l'activité spécifique de l'ADN déterminée selon la méthode à l'acide trichloracétique avait une valeur double de celle obtenue lorsque l'ADN était extrait par la méthode au phénol. Cette différence était expliquée par un entrainement non spécifique de la radioactivité dans les protéines radioactives qui aurait été libérée lors de l'hydrolyse acide. Nos résultats indiquent un écart maximal de 15 p. cent pour l'activité spécifique de l'ADN selon qu'elle est évaluée par la méthode au phénol ou par l'une des deux techniques de précipitation en milieu acide.

Les méthodes d'extraction par précipitation en milieu acide donnent chacune des valeurs comparables et reproductibles.

Conclusion: Ces résultats démontrent que, dans les conditions expérimentales choisies, la ^{3}H-thymidine s'incorpore préférentiellement à l'ADN des hépatocytes. Le précurseur radioactif semble donc pouvoir être valablement utilisé pour suivre la synthèse de l'ADN dans ces cellules : la détermination peut être effectuée par l'une des trois techniques étudiées, à condition que le matériel biologique incorpore activement la ^{3}H-thymidine dans l'ADN. Dans ce cas, la radioactivité éventuellement entraînée par des protéines libérées lors de l'hydrolyse de l'ADN (62) devient négligeable par rapport à celle incorporée par l'acide désoxyribonucléique. Ceci confirme les résultats de Goldspink et Goldberg (64) obtenus lors de l'incorporation du précurseur radioactif dans le foie de rat hepatectomisé.

On constate par ailleurs que la méthode au phénol a un rendement d'extraction de l'ADN plus faible que les méthodes par précipitation à l'acide ; ces dernières sont donc mieux adaptées au traitement de très faibles quantités de tissus, notamment au traitement des cultures cellulaires.

C'est pourquoi la précipitation par les acides a été choisie pour doser l'activité spécifique de l'ADN et notamment celle mise au point de Goldspink et Goldberg (69) puisque cette méthode s'est avérée suffisamment précise à partir de faibles faibles quantités de matériel.

L'activité spécifique de l'ADN sera déterminée "in vitro" sur des cultures cellulaires d'hépatocytes et "in vivo" sur des rats âgés de 10 jours dont on stimule les hépatocytes par une injection de caséine (56), les deux tests étant les plus maniables parmi les méthodes envisagées. Cependant, le test "in vitro" sera à préférer quand on n'aura que peu de substance disponible à tester.

- CHAPITRE II -

ETUDE D'UN EXTRAIT DE FOIE DE RAT :

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE REGULANT LA DIVISION DES HEPATOCYTES

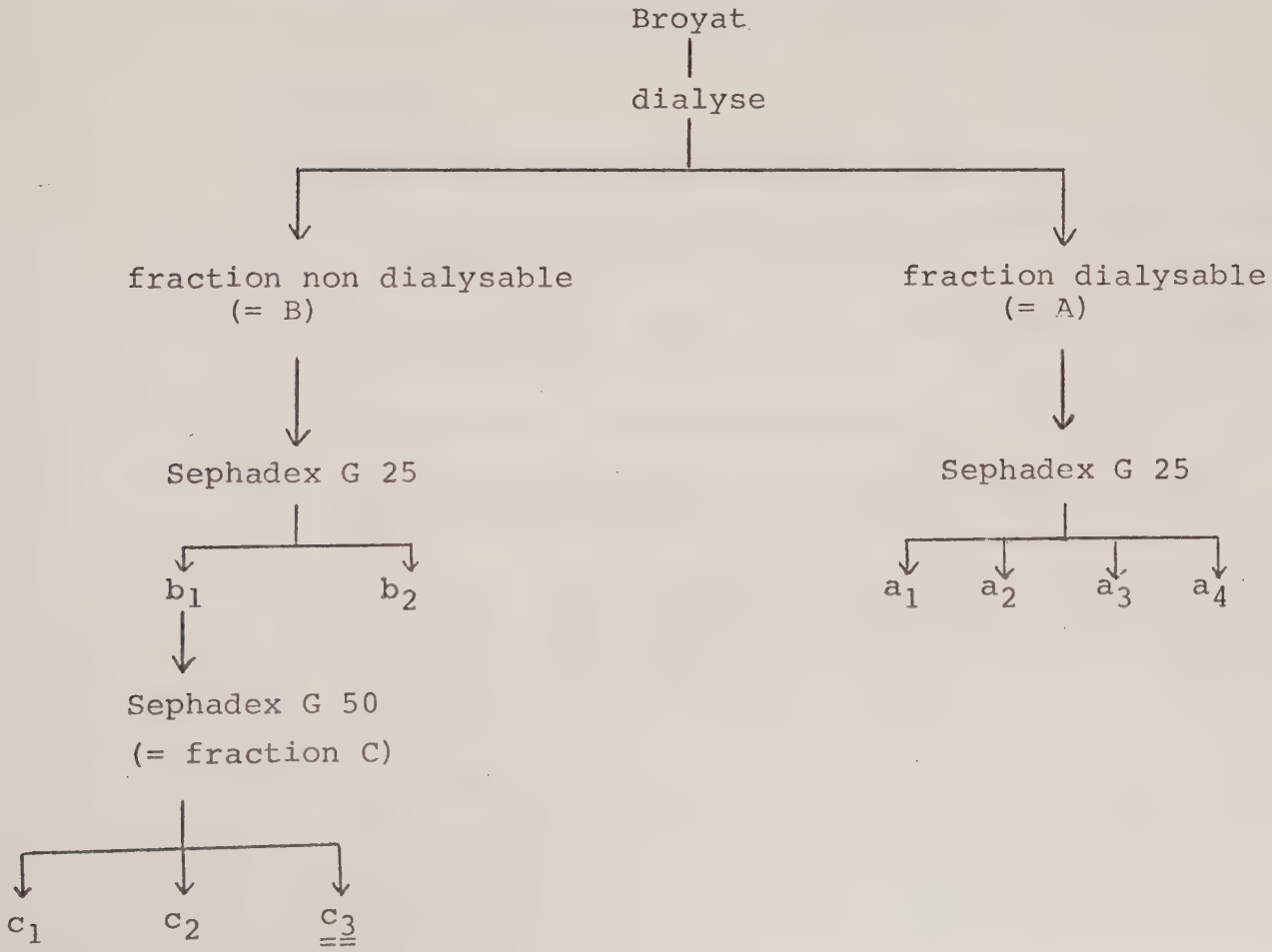
I - FRACTIONNEMENT

Le fractionnement d'un extrait de foie de rat a été mené selon le schéma de la Figure II-1 ; toutes les opérations ont lieu à 0-4°C. Les fractions après lyophilisation sont remises en solution dans l'eau et stérilisées par filtration (filtre Millipore GSWPO 1300).

L'activité des différentes fractions obtenues est testée sur des cultures d'hépatocytes de rat foetal en diluant ces fractions à raison de 100 µg de protéine par ml de milieu. Ces fractions sont mises en contact entre la 18ème et la 48ème heure après la mise en culture.

FIGURE II-1

SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE FOIE DE RAT



.../...

A - DIALYSE PUIS CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 D'UN EXTRAIT DE FOIE DE RAT

1. Méthode

Nous avons choisi la méthode d'extraction du foie utilisée par les précédents auteurs (43) (49) (51) qui consiste à extraire les inhibiteurs à l'eau distillée.

Du foie de rat adulte est broyé dans un Potter (1 volume de foie pour 4 volumes d'eau distillée). Après centrifugation pendant 30 minutes à 4500 g, le surnageant est soumis à une dialyse en continu contre 50 fois son volume d'eau distillée. On recueille alors une fraction A, non dialysable (P.M. > 10.000 daltons) et une fraction B, dialysable (P.M. < 10.000 daltons).

Ces deux fractions, après lyophilisation, sont soumises chacune à une chromatographie sur une colonne de Sephadex G 25 Pharmacia (longueur = 95 cm ; diamètre = 6 cm ; débit = 0,54 ml/mn ; volume mort Vo = 651 ml), l'élution étant faite à l'eau distillée. La zône d'élution de la thymidine est repérée, au préalable, à l'aide de thymidine tritiée afin d'éliminer ultérieurement les fractions éluées de poids moléculaire inférieur ou égal à celui de la thymidine.

L'absorption des fractions éluées est lue à 280 nm sur un spectrophotomètre Gilford afin de suivre l'élution des protéines. On appelle Ve le volume d'élution.

2. Résultats

a) Chromatographie sur Sephadex G 25

- L'extrait non dialysable (= A) donne alors 4 fractions (figure II-2) : a_1, a_2, a_3 et a4.

- L'extrait dialysable (= B) donne deux fractions (figure II-3) : b_1 et b_2.

b) Activité des fractions obtenues

- Test "in vivo" sur les fractions A et B avant chromatographie

L'activité des fractions dialysable B et non dialysable A est comparée (tableau II.1) sur des rats dont les hépatocytes entrent en division partiellement synchrône par une injection sous cutanée de caséine (méthode de Nadal)(56).

Les deux fractions injectées en fin de phase G_1 du cycle induisent une réduction de l'incorporation de la ^3H-thymidine dans l'ADN des hépatocytes de rats traités par rapport à celui des témoins. Cet effet est maximal lorsque les animaux reçoivent la fraction dialysable.

.../...

TABLEAU II-1

ACTIVITE DE LA FRACTION A NON DIALYSABLE ET DE LA FRACTION B DIALYSABLE SUR L'ADN D'HEPATOCYTES DE RAT "IN VIVO" INCORPORANT DE LA ^{3}H-THYMIDINE

Fraction testée	Numéro des rats	Radioactivité en dpm	ADN en µg	Activité spécifique en dpm/µg d'ADN	Valeur moyenne	Activité biologique (Essai/Témoin)
Témoins	1	23900	11	2200	2000	1
	2	27400	12	2300		
	3	22400	16	1400		
	4	25100	13	1900		
Fraction B, dialysable	5	7300	14	500	900	0,45
	6	11300	14	800		
	7	15700	9	1700		
	8	5800	12	500		
Fraction A, non dialysable	9	21700	12	1800	1400	0,70
	10	11800	8	1500		
	11	13100	14	900		
	12	11200	9	1200		

Légende : Les expériences sont faites sur quatre animaux d'une même portée.

Des rats de 20 g reçoivent :

- au temps t_o une injection sous-cutanée de 0,4 ml d'une solution de caséine à 3 % dans la soude à 3°/₀₀,
- au temps t_o + 12 heures, une injection sous-cutanée de 0,3 ml de sérum physiologique pour les témoins ou un extrait correspondant à 1,5 g de foie frais,
- au temps t_o + 17 heures, une injection de 20 µCi de ^{3}H-Thymidine à 5 µCi/ mM.

Les animaux sont sacrifiés au temps t_o + 18 heures. Le foie prélevé est congelé avant d'être traité.

Ce résultat suggère que l'extrait hépatique — en particulier, la fraction dialysable — contient une ou des substance(s) inhibant l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine. Mais à ce stade de purification, la thymidine endogène, dans l'extrait dialysable en particulier, n'est pas éliminée et celle-ci peut donc interférer dans le test.

C'est pourquoi, on étudie l'action de ces deux fractions sur des tests "in vitro" après chromatographie sur Sephadex G 25 ; à ce stade, la thymidine endogène de l'extrait est éliminée.

- Test "in vitro" (tableaux II.2 et II.3)

L'activité des fractions est mesurée par inhibition de l'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture.

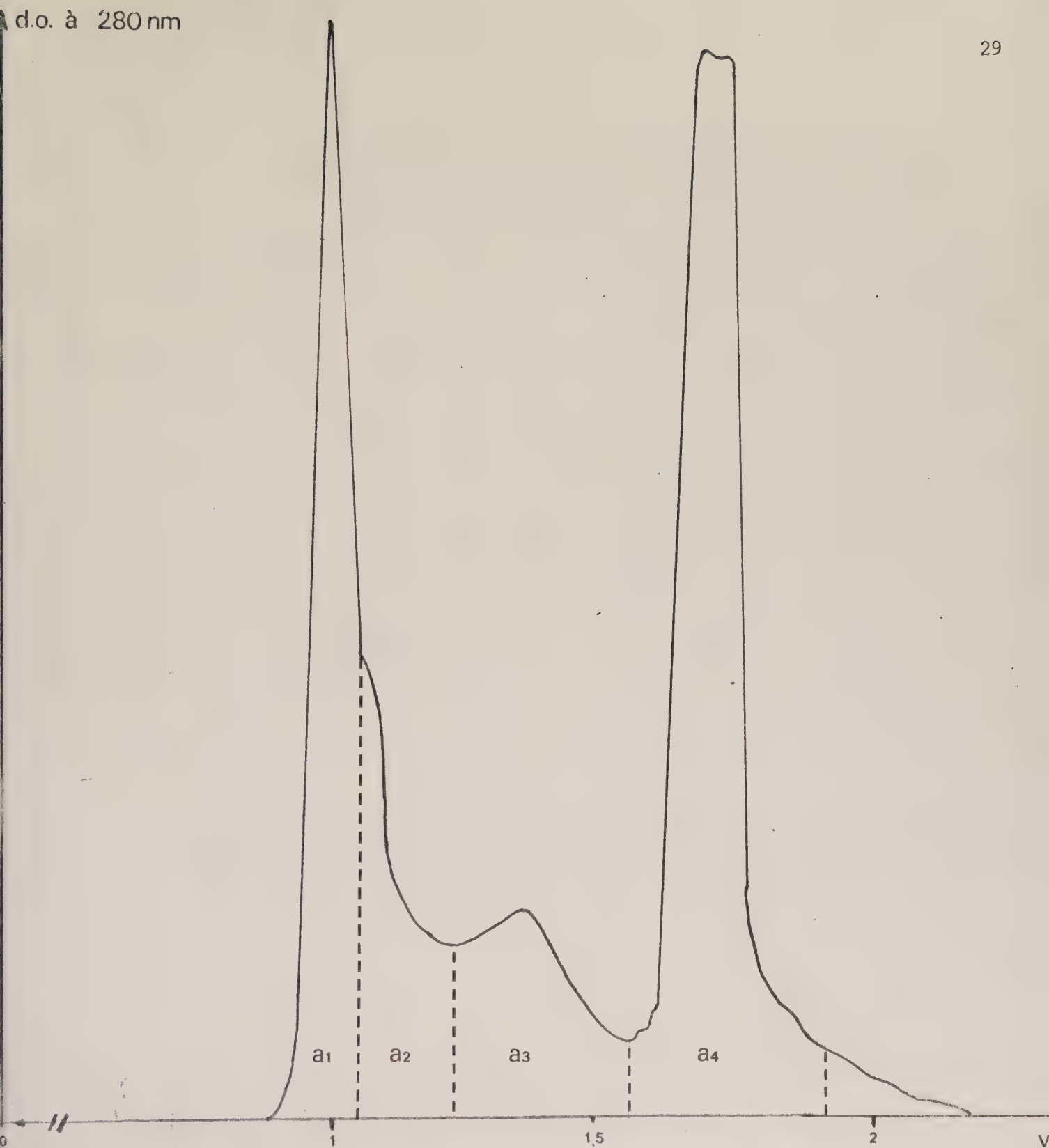
TABLEAU II-2

ACTIVITE SUR L'ADN D'HEPATOCYTES EN CULTURE DE FRACTIONS DE FOIE DE RAT

APRES CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G 25 DE L'EXTRAIT A, NON DIALYSABLE

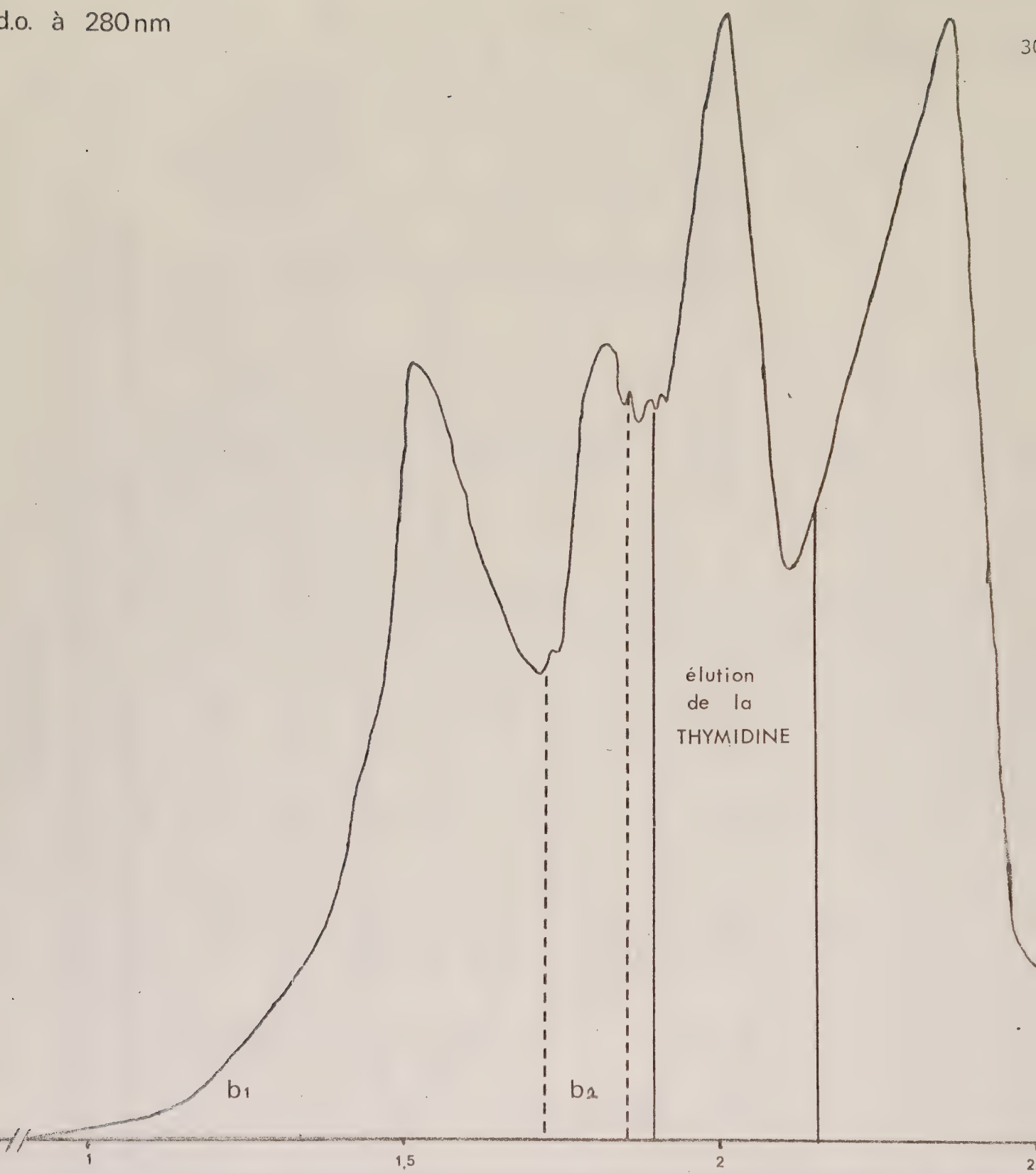
Fraction testée	Ve/Vo	dpm (Ⓧ)	µg d'ADN (Ⓧ)	Radioactivité spécifique de l'ADN : dpm/ µg d'ADN	Activité biologique de la fraction (Rapport Essai / Témoin)
a_1	0,92 - 1,07	58850 33900	78 47	760 730	[0,9 0,86] Valeur moyenne m = 0,88
a_2	1,07 - 1,24	49300 45700	60 72	820 640	[0,97 0,76] m = 0,87
a_3	1,24 - 1,54	42750 42850	62 48	690 890	[0,95 1,06] m = 0,87
a_4	1,54 - 1,88	41500 43200	57 37	730 1180	[0,87 1,40] m = 1,14
Témoin (milieu de culture)		34150 36200	42 44	840 840	1

(Ⓧ) = Résultat moyen pour 2 boites.



extrait de foie de rat : Fraction non dialysable(A)chromatographiée sur Séphadex G_{25}

FIGURE II-2



extrait de foie de rat : Fraction dialysable (B) chromatographiée sur Séphadex G_{25}

FIGURE II-3

On constate alors (Tableau II-1) que l'extrait de foie non dialysable ne donne aucune activité biologique après chromatographie sur Sephadex G 25. Ceci n'exclut pas cependant l'existence d'inhibiteurs de hauts poids moléculaires qui auraient pu être dénaturés au cours de l'extraction.

TABLEAU II-3

ACTIVITE SUR L'ADN D'HEPATOCYTES EN CULTURE DE FRACTIONS DE FOIE DE RAT APRES CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G 25 DE L'EXTRAIT B DIALYSABLE

Fraction testée	Ve / /Vo	dpm	µg d'ADN (※)	Radioactivité spécifique (dpm/ µg d'ADN)	Activité biologique (Rapport Essai / Témoin)
b_1	0,92-1,72	36400 37000	87 78	418 474	[0,51 0,57] valeur moyenne m = 0,54
b_2	1,72-1,85	40200 67100	55 68	730 980	[0,88 1,18] m = 1,03
Témoin (= milieu de culture)		40600 34400	53 39	770 880	1

(※) = Résultat moyen pour 2 boites.

Par contre, cette activité semble localisée (Tableau II-3) au niveau de la fraction b_1 provenant de la chromatographie sur Sephadex G 25 de l'extrait dialysable de foie de rat. Elle est thermolabile comme le suggère le Tableau II-4 .

.../...

TABLEAU II-4

ACTION DE LA CHALEUR SUR L'ACTIVITE DE LA FRACTION b_1

Fraction testée	dpm (※)	µg d'ADN (※)	Radioactivité spécifique de l'ADN (dpm/ µg d'ADN)	Activité biologique (Rapport Essai / Témoin)
b_1 (après traitement à 100°C pendant 5 minutes)	29350 29900	28 30	1048 996	valeur moyenne [0,80 0,76] m = 0,78
b_1 (non traitée par la chaleur)	26100 48800	37 78	705 626	[0,54 0,48] m = 0,51
Témoin (= milieu de culture)	45900 32700	34 26	1350 1260	1

(※) = Résultat moyen pour 2 boites

B - CHROMATOGRAPHIE SUR UNE COLONNE DE SEPHADEX G 50 DE LA FRACTION b_1

1. Méthode

Une partie de la fraction b_1, après lyophilisation, est reprise dans de l'eau distillée et chromatographiée sur une colonne de Séphadex G 50 (longueur = 95 cm ; diamètre = 5 cm ; débit = 0,47 ml/mn ; volume mort Vo = 413 ml).

L'élution est faite à l'eau distillée et l'absorption des fractions éluées lue à 280 nm.

2. Résultats

a) Chromatographie sur Séphadex G 50

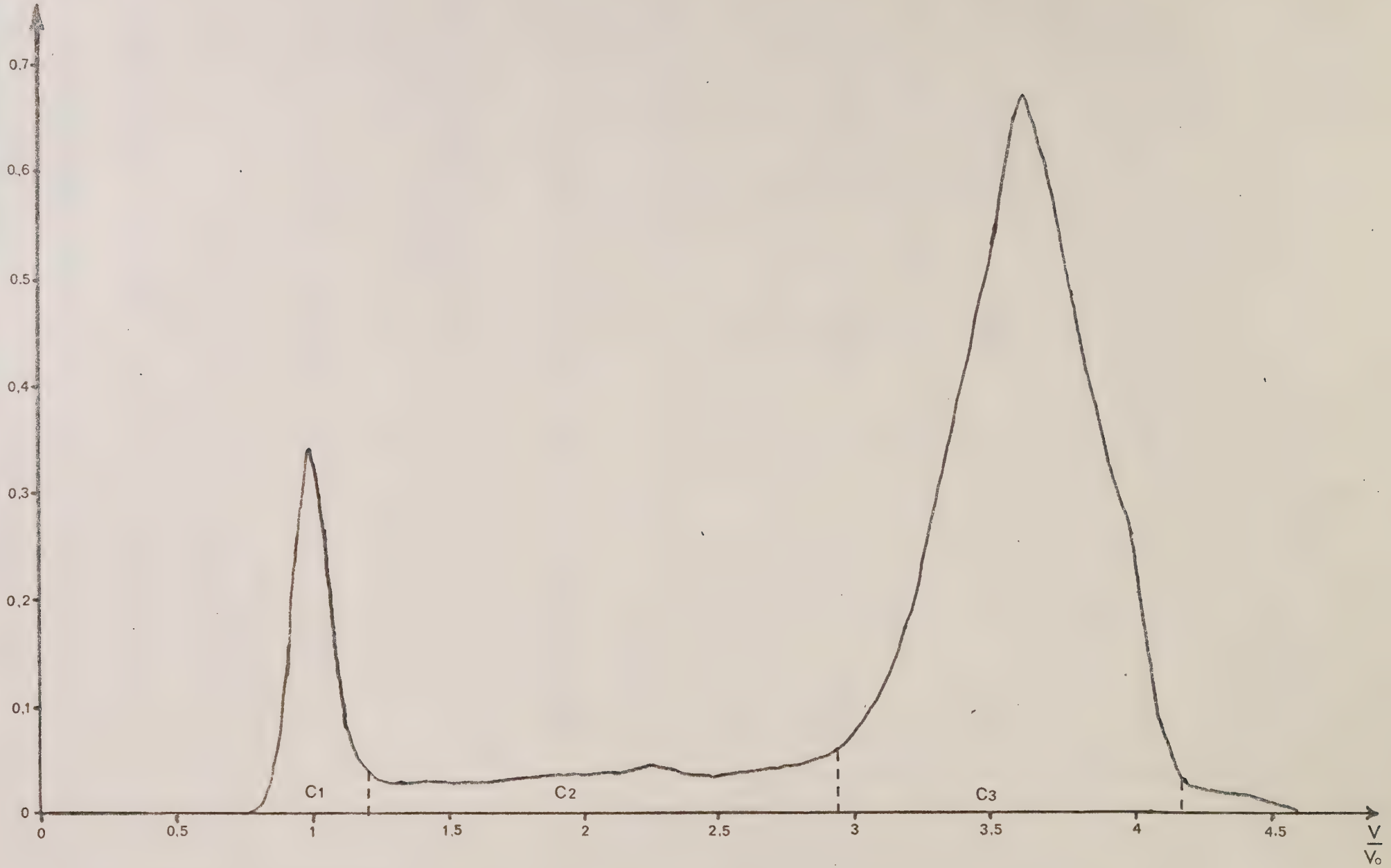
La fraction b_1 donne 3 fractions : c_1, c_2 et c_3.

Les fractions c_1 et c_3 absorbent à 280 nm mais pas la fraction c_2 (figure II-4).

b) Activité des fractions obtenues (Tableau II-5)

On constate d'après le Tableau II-5 que l'activité est principalement localisée au niveau de la fraction c_3.

.../...



Extrait de foie de rat : Fraction C = b_1 chromatographiée sur Séphadex G_{50}

TABLEAU II-5

ACTIVITE SUR L'ADN D'HEPATOCYTES EN CULTURE DES FRACTIONS OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G 50 DE L'EXTRAIT b_1

Fraction testée	Ve / /Vo	dpm (Ⓧ)	µg d'ADN (Ⓧ)	Radioactivité spécifique de l'ADN (dpm/µg d'ADN)	Activité biologique (Rapport Essai/Témoin)
c_1	1 -1,24	29500 36950	30 34	990 1230	[0,76 0,95] valeur moyenne m = 0,86
c_2	1,24-2,90	33800 31200	33 28	1020 1110	[0,79 0,86] m = 0,83
c_3	2,90-4,20	11300 7660	20 17	560 450	[0,43 0,35] m = 0,39
Témoin (= milieu de culture)		45900 32700	34 26	1350 1260	1

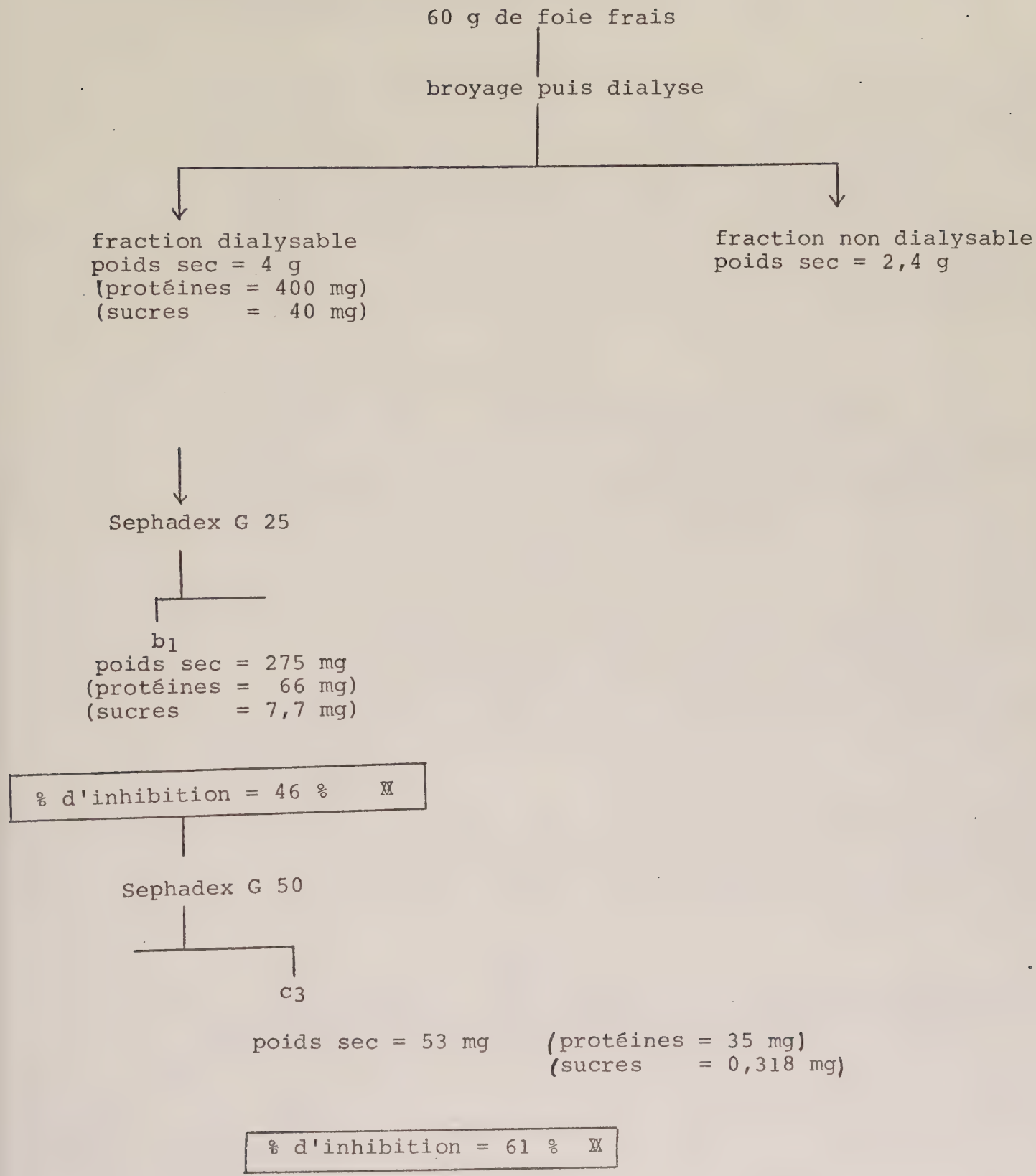
(Ⓧ) = Résultat moyen pour 2 boites.

C - BILAN DU FRACTIONNEMENT

Au cours des différentes étapes du fractionnement, les protéines et les sucres ont été dosés dans les fractions actives. Le bilan peut être résumé dans la figure II-5 en partant de 60 g de foie frais.

.../...

FIGURE II-5



✠ Résultats obtenus sur des tests "in vitro" à partir de 100 µg/ml de protéines d'extrait testé.

Si on considère le rapport $\frac{\text{Protéines}}{\text{Sucres}}$ des fractions actives, on constate que l'activité inhibitrice est d'autant plus importante que le rapport augmente, ce qui suggère un enrichissement en protéines de la fraction active.

Le domaine approximatif de fractionnement du Sephadex G_{25} est entre 1000 et 5000 daltons ; celui du Sephadex G_{50} se situe entre 1500 et 30000 daltons. D'après l'élution de l'activité sur Sephadex G_{25}, cette activité correspondrait aux molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 5000 daltons. L'élution sur Sephadex G_{50} montre un poids moléculaire inférieur à 30000 daltons ; or cette fraction provient de la fraction B dialysable ; on peut estimer que la dialyse laisse passer les molécules dont le poids moléculaire est < 10000 daltons (73). L'activité semble donc associée à une molécule dont le poids moléculaire serait compris entre 5000 et 10000 daltons

II - PROPRIETES DE LA FRACTION C_3

A - Action sur les biosynthèses de macromolécules

Nous avons étudié l'action de la fraction C_3 sur l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines et sur celle de l'acide orotique marqué dans l'ARN des hépatocytes de rat foetal en culture.

1. Conditions de marquage

L'incorporation de l'acide ^{14}C - orotique (CEA - 52 m Ci/mmole, 0,56 µCi/ml de milieu) est faite entre la 24ème et la 44ème heure après la mise en culture et celle des ^{14}C - Acides aminés d'un hydrolysat (CEA, 140 mCi/mmole 1,39 µCi/ml de culture) entre la 24ème et la 44ème heure.

2. Résultats

Dans ces conditions, les résultats (tableaux II.6, II.7) montrent que cette fraction stimule l'incorporation d'acide orotique dans l'ARN sans pour autant avoir d'effet au niveau de la synthèse protéique.

TABLEAU II.6

Action de la fraction C_3 sur l'incorporation de ^{14}C-Acides aminés dans les protéines d'hépatocytes de rat foetal en culture

Fraction éprouvée	dpm	µg protéines	Radioactivité spécifique dpm/µg	Activité biologique : Essais/Témoins
Milieu de culture = Témoins	90.700	450	262	1
	61.100	267	228	
	185.100	510	363	
	165.300	483	342	
			Moyenne = 284	
Fraction C_3 (100 µg/ml	118.500	483	244	1,10
	119.000	513	232	
	193.700	490	395	
	185.100	483	383	
			= 313	

TABLEAU II.7

Action de la fraction C_3 sur l'incorporation de ^{14}C-Acide orotique dans l'ARN d'hépatocytes de rat foetal en culture

Fraction éprouvée	dpm	µg d'ARN	Radioactivité spécifique de l'ARN dpm/µg	Moyenne	Activité biologique : Essai/Témoins
ilieu de cul- ure = Témoin	62.900 49.100	143 115	440 427	434	1
ractions C_3/ 00 µg/ml	85.400 113.500	135 148	734 767	755	1,7

La radioactivité spécifique étant doublée mais la quantité d'ARN par boite ne variant pas, il semblerait que l'effet de la fraction C_3 soit surtout marqué au niveau de la perméabilité de la cellule vis-à-vis de l'acide orotique. Un résultat comparable a été obtenu dans le cas d'inhibiteurs naturels des lymphocytes (communication personnelle des Dr. Garcia-Giralt et Coelho).

B - Effet de la dose de la fraction C_3 sur l'incorporation de la ^3H-thymidine

Il existe une relation entre la dose et l'activité de la fraction C_3 (tableau II-8).

TABLEAU II.8

Relation entre la dose et l'activité de la fraction C_3 sur l'incorporation de ^3H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture

Fraction éprouvée	dpm	µg d'ADN	Radioactivité spécifique de l'ADN dpm/µg	Moyenne	Activité biologique Essai/témoins
Milieu de cul- ture=témoins	43.400 40.400	61 56	711 721	716	1
C_3 100 µg/ml	15.600 18.600	49 55	318 338	328	0,46
C_3 50 µg/ml	19.800 26.300	43 58	460 453	456	0,63
C_3 25 µg/ml	35.800 34.900	62 59	577 591	584	0,82

C - Cytotoxicité

Les observations au microscope à contraste de phase n'ont jamais montré d'effet cytotoxique apparent de la fraction C_3. De plus, si on incube la fraction C_3 (à une concentration de 100 µg/ml en protéines) avec les hépatocytes, de la 18ème à la 40ème heure et que ces hépatocytes soient soustraits à l'action de cette fraction entre la 40ème et la 46ème heure, on constate alors (tableau II.9) que l'incorporation de ^3H-thymidine entre la 46ème et la 48ème heure redevient comparable à celle des hépatocytes témoins. On peut donc conclure à l'absence de toxicité du produit.

TABLEAU II.9

Innocuité de la fraction C_3 après son retrait sur l'incorporation de ^3H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture

Fraction éprouvée	dpm	dpm d'ADN	Activité spécifique dpm/µg d'ADN	Moyenne	Activité biologique Essai/Témoins
Milieu de culture=témoins	43.400 40.400	61 56	711 721	716	1
C_3 incubé jusqu'au marquage	15.600 18.600	49 55	318 338	328	0,46
C_3 soustrait 6 heures avant le marquage	41.200 37.200	60 53	687 702	694	0,97

D - Action de la fraction C_3 sur un hépatome de rat

L'inhibition de l'incorporation de la ^3H-Thymidine dans l'ADN pourrait aussi s'interprêter par une dégradation enzymatique accrue de celle-ci. Un comptage de cellules permettrait alors de confirmer le fait que l'inhibition bloque la division cellulaire etpréciser à quel stade.

C'est pourquoi, nous avons testé la fraction C_3 sur un hépatome de rat en culture cellulaire provenant d'un hépatome Reubera traité par des carcinogènes chimiques, en admettant que le comportement de l'hépatome en culture est à peu près similaire au foie foetal en culture.

En effet, les cellules de l'hépatome peuvent être énumérées alors que ceci n'est pas possible pour les hépatocytes de rat foetal. Le tableau II-10 montre que la fraction C_3 inhibe à 51 % la division cellulaire de l'hépatome. Par contre, on constate que la radioactivité spécifique de l'ADN ne varie pas dans les mêmes proportions entre les hépatomes traités et les hépatomes non traités. Ceci s'explique si l'on compare la teneur en ADN dans les cellules : on s'aperçoit alors que les cellules d'hépatome traitées par la fraction C_3 ont deux fois plus d'ADN que les cellules non traitées.

.../...

TABLEAU II.10

Action de la fraction C_3 sur un hépatome de rat

a) Incorporation de la ^3H-thymidine

Produit testé	dpm	µg d'ADN	Radioactivité spécifique de l'ADN (dpm/µg)	Activité Biologique Essai/Tém.	Pourcentage d'inhibition
raction 3	160.000 145.600	233 246	686 591 valeur moyenne = 644	0,70	30 %
ilieu de ulture = émoin	200.000 183.000	226 193	885 948 = 917	1	0 %

b) Numération cellulaire

Produit testé	Nombre de cellules par boite	Pourcentage d'inhibition $(1 - \frac{\text{Essai}}{\text{Témoins}}).100$	µg d'ADN/10^6 cellules
	Valeur moyenne		Valeur Moyenne
Fraction C_3	2.10^6 $1,7.10^6$ $1,9\ 10^6$	51 %	117 145 131
Milieu de culture = Témoin	$4,2.10^6$ $3,6.10^6$ $3,9\ 10^6$	0 %	54 54 54

Cette constation permet de préciser que la fraction C_3 bloque les cellules de l'hépatome en phase G_2 du cycle cellulaire, phase où l'ADN est déjà répliqué mais où la cellule n'est pas encore entrée en division.

Ce résultat est différent de ce qu'obtiennent Simard et al. (4 avec un extrait de foie de lapin ; cet extrait agit en bloquant complètement la transition $G_1 \rightarrow S$ sur des tranches de foie de rat en survie.

.../...

III - SPECIFICITE DE LA FRACTION ACTIVE

Nous avons vu que l'extrait de foie de rat contient une activité inhibitrice de l'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture. Nous avons alors voulu savoir si cette fraction est active sur des cellules autres que les hépatocytes de rat foetal.

A - Action des fractions non dialysables (A) et dialysables (B) de l'extrait de foie de rat sur la rate et le rein de rat "in vivo"

Les fractions non dialysables et dialysables ont été testées "in vivo" sur des rats de 10 jours "stimulés" par une injection de caséine selon la méthode de Nadal (56). On a mesuré et comparé l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans l'ADN du foie, de la rate et des reins des rats testés.

Les résultats indiquent (tableau II-11) la présence dans la fraction dialysable d'un ou de plusieurs facteurs inhibant préférentiellement l'incorporation du précurseur marqué dans l'ADN des hépatocytes. Cependant, on constate une inhibition plus faible au niveau des reins tant avec la fraction dialysable (B) qu'avec la fraction non dialysable (A).

Ceci peut signifier soit que l'extrait hépatique — et en particulier, la fraction dialysable — contiennent une ou des substances inhibant spécifiquement l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans le foie, soit que des inhibiteurs non spécifiques présents dans ces fractions agissent sur la division cellulaire des tissus des animaux traités : dans ce cas, la méthode de Nadal (injection de caséine) provoquant précisément une stimulation et une synchronisation au niveau des hépatocytes des animaux, ces inhibiteurs voient leur effet amplifié sur les cellules hépatiques.

B - Action de la fraction C_3 sur l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans l'ADN de lignées permanentes

La fraction C_3 a été testée sur des lignées permanentes de lymphocytes humains (lignée lapotaire) selon (66) et de fibroblastes de souris (lignée L, clône 1D) selon (67). Le tableau II-12 montre que dans ces deux cas, la fraction C_3 n'a pas d'effet détectable sur l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans l'ADN.

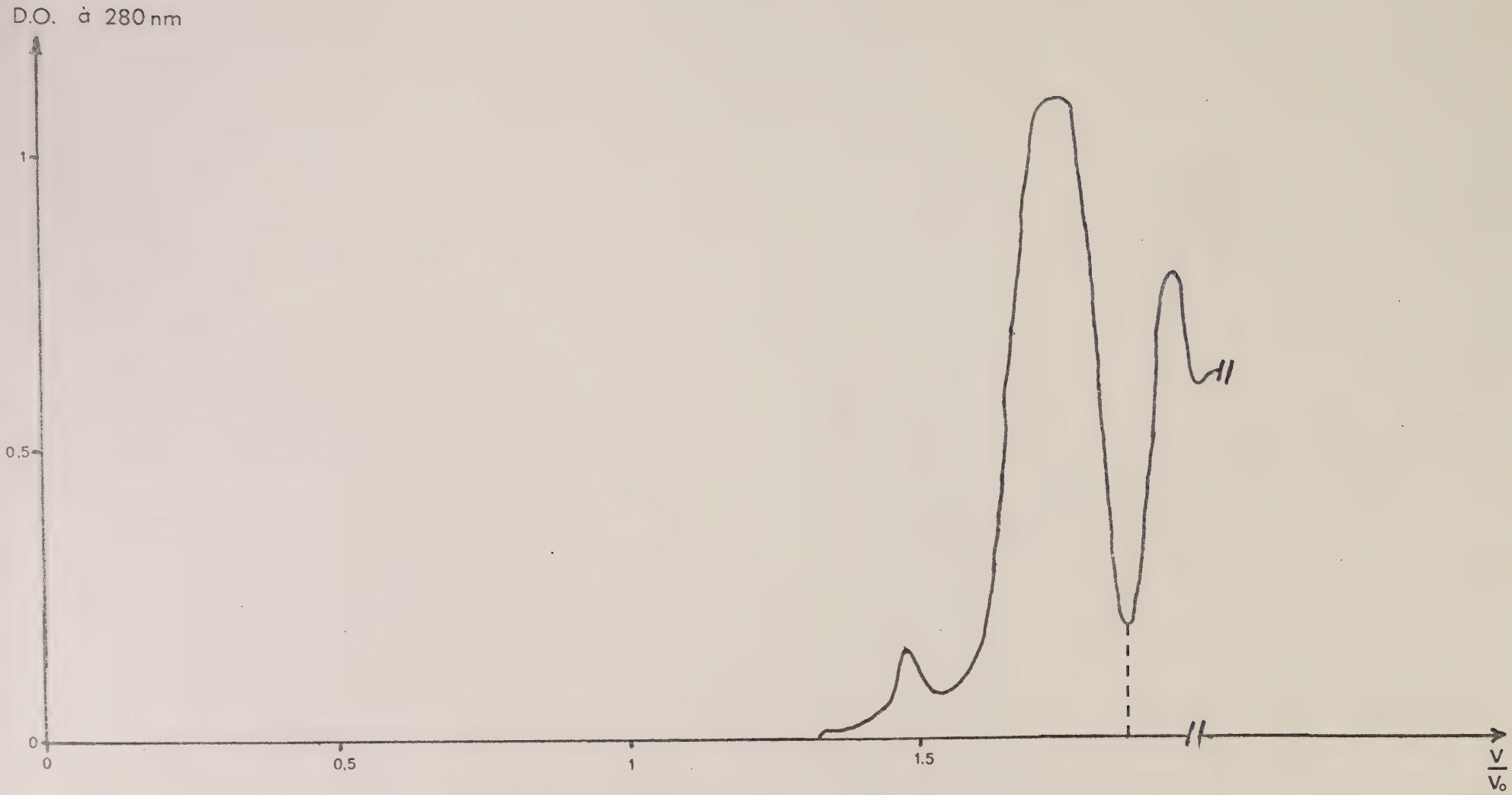
TABLEAU II-11

Action des fraction dialysables et non dialysable sur l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans l'ADN du foie, de la rate et reins de rats "in vivo"

	Numéro des rats		Radioactivité en dpm	ADN en µg	Activité spécifique en dpm/mg d'ADN -valeur moyenne	Essai/ Témoin
	Témoins	1	23900	11	2100	
		2	27400	12	2300	
		3	22400	16	1400	2000	1
		4	25100	13	1900	
	Fraction dialysable	5	7300	14	500	
		6	11300	14	800	
		7	15700	9	1700	900	0,45
		8	5800	12	500	
	Fraction non dialysable	9	21700	12	1800	
		10	11800	8	1500	
		11	13100	14	900	1400	0,70
		12	11200	9	1200	
	Témoins	1	12500	28	450	
		2	11700	22	530	
		3	10100	17	590	520	1
		4	10000	20	500	
	Fraction dialysable	5	2800	9	310	
		6	5900	14	420	
		7	4700	8	590	460	0,88
		8	2000	4	500	
	Fraction non dialysable	9	10300	19	540	
		10	6300	11	570	
		11	9400	15	630	570	1,1
		12	6300	12	520	
	Témoins	1	4600	28	160	
		2	5800	22	260	
		3	6800	22	310	240	100
		4	3900	17	230	
	Fraction dialysable	5	3600	28	130	
		6	4500	29	160	
		7	5900	31	190	150	63
		8	3300	26	130	
	Fraction non dialysable	9	3800	28	140	
		10	4200	26	160	
		11	4800	30	160	150	63
		12	4300	28	150	

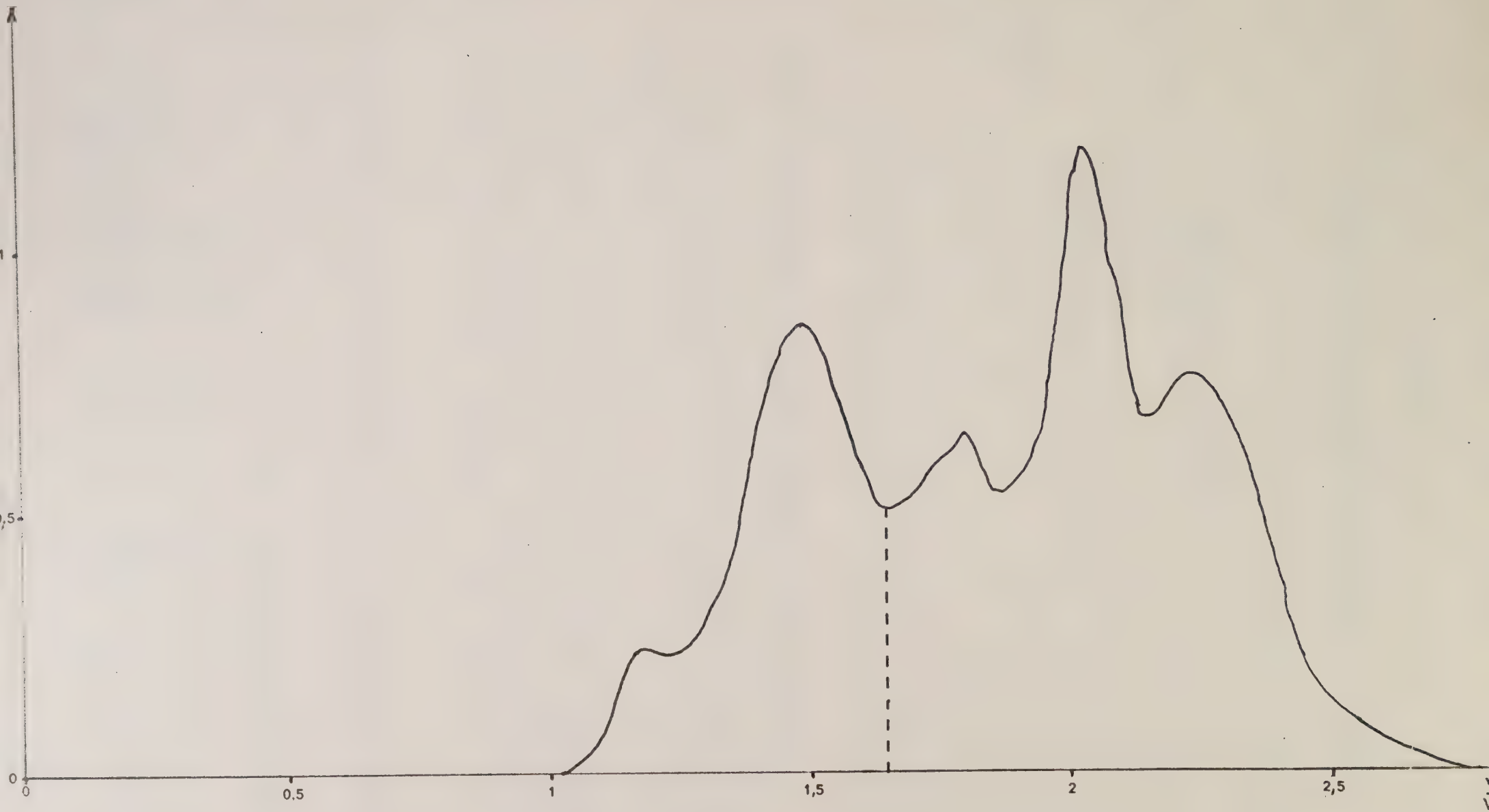
Légende :

Les conditions d'expériences sont les mêmes que celles décrites à la légende du Tableau II-1. Au temps t_o + 18 heures, le foie, la rate et les reins sont prélevés et congelés avant d'être traités.



Extrait de rein de rat: fraction dialysable chromatographiée sur Séphadex G_{25}

Fig. II-6



Extrait de rate de rat: fraction dialysable chromatographiée sur Séphadex G_{25}

Fig. II-7

TABLEAU II-12

Action de la fraction C_3 sur l'incorporation de la ^3H-thymidine dans l'ADN de lignées permanentes

		Témoin	C_3 (100 µg/ml)
Lignée Lapotaire (lymphocytes humains)	Radioactivité incorporée dans l'ADN en cpm/10^6 cellules	15.500	15.300
	Activité biologique	1	0,99
Fibroblastes de souris (lignée L clône 1 D)	Radioactivité incorporée dans l'ADN en cpm/10^6 cellules	944	902
	Activité biologique	1	0,96

Il semblerait d'après ces résultats que la fraction active inhibe spécifiquement le foie. Cependant, un nombre plus important de déterminations sur différents tissus est nécessaire pour étayer cette possibilité.

IV - ACTION D'UN EXTRAIT DE REIN ET DE RATE DE RAT SUR DES HEPATOCYTES DE RAT FOETAL EN CULTURE

Nous avons effectué une expérience préliminaire afin de savoir si l'activité présente dans l'extrait de foie de rat est spécifique du foie. Un extrait de rein et un extrait de rate de rat ont été préparés selon les mêmes méthodes que celles utilisées pour l'extrait de foie.

Après dialyse, la fraction dialysable de ces extraits est passée sur colonne de Sephadex G25 dont les paramètres sont comparables à ceux de la colonne utilisée pour l'extrait de foie. L'absorption des fractions éluées est suivie à 280 nm (fig. II-6 et II-7). Les fractions correspondant à l'élution de b_1, sont alors collectées et testées sur les hépatocytes de rat foetal en culture incorporant de la ^3H-Thymidine dans l'ADN (Tableau II-13).

TABLEAU II.13

Action d'extraits d'organes autres que le foie sur l'incorporation de ^3H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture

a) Extrait de rein

Produit testé	dpm	µg d'ADN	Radioactivité spécifique	v.moy.	Activité biologique Essai/Témoin
Milieu de culture = Témoin	43.400 40.400	61 56	711 721	716	1
Fraction b_1 du rein : (100 µg/ml en protéines)	25.800 22.300	63 57	410 391	400	0,56
Fraction b_1 du foie = (100 µg/ml en protéines)	29.900 33.700	70 78	427 432	430	0,60

b) Extrait de rate : Les boites ont été comptées directement après précipitation à l'acide trichloracétique à 5 % et filtration sur papier Whatman GF/C.

	cpm/boite	Valeur moyenne	Activité biologique (Essai/Témoin)
ilieu de culture témoins)	53.100 56.300 55.800 51.700	54.200	1
raction b_1 e la rate 100 µg/ml en rotéine)	32.200 36.500 29.300 30.600	32.100	0,59
raction b_1 u foie 100 µg/ml en rotéines)	30.400 29.200 33.200 30.800	30.900	0,57

Ces résultats semblent indiquer l'existence dans ces extraits d'organes d'une activité inhibitrice de l'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture. Cette activité se trouve en outre localisée dans la fraction b_1 comme pour le foie c'est-à-dire qu'elle est éluée dans les mêmes conditions.

Cependant, ceci ne prouve nullement l'identité chimique de ces trois activités ; la fraction b_1 correspond en fait à un mélange de molécules. Par contre, il n'est pas exclu que des inhibiteurs non spécifiques soient présents dans ces extraits d'organes. Par exemple, Simard et al. (43) ont montré que dans le foie de lapin, coexistaient des inhibiteurs agissant spécifiquement sur le foie et d'autres inhibiteurs n'ayant pas de spécificité tissulaire.

CONCLUSION :

Le foie de rat possède une activité inhibitrice de l'incorporation de la ^{3}H-thymidine dans l'ADN d'hépatocytes de rat foetal en culture ; il semblerait que cette inhibition se produit également "in vivo".

Cette activité pourrait être liée à une ou plusieurs molécules dont le poids moléculaire est compris entre 5000 et 10000 daltons ; elle est thermolabile (traitée à 100°C pendant 5 mn).

Si on considère les propriétés biologiques de cet extrait sur des hépatocytes en culture, on constate qu'une fraction de cet extrait inhibe l'incorporation de la ^{3}H-Thymidine dans l'ADN, qu'elle stimule l'incorporation d'acide orotique marqué dans l'ARN et qu'elle est sans action sur l'incorporation d'acides aminés radioactifs dans les protéines. On ne peut cependant pas dire que ces propriétés soient dues à une même molécule présente dans cette fraction.

Dans tous les cas, cette fraction n'est pas toxique pour les hépatocytes en culture.

En ce qui concerne l'inhibition de synthèse de l'ADN, cet effet est proportionnel à la dose.

Ces résultats sont un peu différents de ceux de Verly et al. qui ont étudié une préparation purifiée de foie de lapin (43) (74). Certes, ces derniers trouvent comme nous que le facteur inhibant la synthèse d'ADN est non toxique pour les hépatocytes en culture et qu'il est constitué d'une ou de plusieurs molécules de faible poids moléculaire. Cependant, ils constatent que leur extrait inhibe en plus la synthèse d'ARN et la synthèse protéique. Enfin, leur facteur semble bloquer les hépatocytes dans la transition $G_1 \longrightarrow S$, alors que le nôtre semble surtout bloquer la transition $G_2 \longrightarrow M$ — au moins sur un hépatome —.

De toute façon, on ne peut espérer comprendre le mécanisme d'action de ce facteur tant qu'il ne sera pas obtenu à l'état pur.

Notre fraction est sans action sur des lignées permanentes d'origines autres que le foie de rat . "In vivo", il semble que cette fraction n'agit pas sur la rate de rat mais quand même d'une façon moindre — sur les reins de rat—.

Or Volm, Mattern et Wayss ont conclu qu'une substance de type "chalone" ne pouvait être trouvée dans le foie, du fait même que leur extrait de foie ne présentait pas de spécificité d'action "in vitro",ni "in vivo" pour les hépatocytes.

Il est fort possible qu'en réalité coexistent dans le foie des inhibiteurs spécifiques du foie et des inhibiteurs qui n'ont pas de spécificité tissulaire. C'est en tous cas, ce qu'ont montré Simard et al. (43) et ce que suggère le tableau II-13, où l'on montre que des extraits d'autres tissus peuvent contenir des activités inhibant la synthèse d'ADN dans le foie.

.../...

C'est pourquoi on ne peut pas trancher d'une façon définitive en faveur de l'absence ou de la présence d'une spécificité d'action tissulaire. Nous ne pourrons donc être aussi catégoriques que Volm et al. en ce qui concerne l'existence d'une chalone hépatique chez le rat.

- PUBLICATIONS -

BERNEMAN A., LENFANT M. et LAMBIOTTE M., *Incorporation de la thymidine tritiée dans le DNA de foie de rat : critique des différentes méthodes d'évaluation*, *Biochimie* , 1975, 57, 773-777

BERNEMAN A., ELLOUZ R., LENFANT M. et GARCIA-GIRALT E., *Inhibition de l'incorporation de la thymidine tritiée dans le foie foetal de rat en culture cellulaire par un extrait hépatique fractionné*, *Comptes Rendus Acad. Sci.*, 1975, Série D., 187-190

- BIBLIOGRAPHIE -

) HOWARD A. and PELC S.R., *Heredity* , 1953, Suppl. 6, 261-273

) SMITH J.A. and MARTIN L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1973, 70, 1263-1267

) BULLOUGH W.S., *Nature*, 1963, 199, 859-862

) WENT H.A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 1960, 90, 422-429

) PRESCOTT D.H., *Recent results in Cancer Research* , 1967, 79-90

) SISKIN J.E. and KINOSITA R., *Exp. Cell Res.*, 1961, 9, 509-519

) DEFENDI V. and MANSON L.A., *Nature* , 1963, 198, 359

) KILLANDER D. and ZETTERBERG A., *Exp. Cell Res.*, 1965, 40, 12

) NILAUSEN K. and GREEN H., *Exp. Cell Res.* , 1965, 40, 166

) GRAHAM C.F. and MORGAN R.W., *Devel. Biol.*, 1966, 14, 439

) ROBBINS E. and SCHAFF M.D., *J.Cell Biol.*, 1967, 34, 684

) GELFANT S., *Exp. Cell Res.* , 1962, 26, 395-403

) GELFANT S., *A new theory on the mechanison of cell division in "Cell Growth and Cell division" RTC. Harris Ed. Academie Press Inc. N.Y.* , 1963

) PEDERSON T. and GELFANT S., *Exp. Cell Res.*, 1970, 59, 32

) SZENT-GYORGYI, *Perspectives in Biology and Medicine, Spring* , 1968, 350-357

) SMITH J.A., *Biochemical Society Transactions* , 1973, 1, 1078

) WEISS P. and KAVANAU J.L., *J. of gen. physiol.* , 1957, 41, n° 1, 1-47

) SIMMS H.S. and STILLMAN N., *J. of gen. physiol.*, 1936-1937, 20, 621-629

) BULLOUGH W.S. and LAWRENCE E.B., *Proc. Roy. Soc. B.* , 1960, 151, 517

) BULLOUGH W.S. and LAWRENCE E.B., *Exp. Cell Res.*, 1964, 33, 176-194

) BULLOUGH W.S., HEWITT C.L. and LAWRENCE E.B., *Exp. Cell Res.* , 1964, 36, 192-200

) IVERSEN O.H., *Acta Path. Microbiol. Scand.*, Suppl., 1961, 148, 91

) IVERSEN O.H., AANDAHL E. and ELGJO K., *Acta Path. Microbiol. Scand.* , 1965, 64, 506

) ELGJO K., *Natl. Cancer Inst. Monogr.* , 1973, 38, 71-78

) MARKS F., *Natl. Cancer Inst. Monogr.* , 1973, 38, 79

) NOME O., *Virchows Arch. B Cell Path.*, 1975, 19, 1-25

) BULLOUGH W.S., *Biol. Rev.* , 1962, 37, 307-342

) IVERSEN O.H., In *Ciba Foundation Symposium on Homostatic Regulators, Wolstenholme and J. Kinght (J. and A. Churchill Ltd. London)*, 1969, 29-53

) ARGYRIS T.S., *Amer. Zool.* 1956, 11, 134-149

) BULLOUGH W.S. and LAWRENCE E.B., *European J. Cancer* , 1968, 4, 607-615

1) DEWEY D.L., *J. Nat. Cancer Inst.* , 1973

2) HOUCK J.C., WEIL R.L. and SHARMA V.K., *Nature New Biology* , 1972, 240, 210-211

3) SAETREN H., *Acta Chem. Scand.*, 1963, 17, 889

4) CHOPRA D.P. and SIMNET J.D., *Nature*, 1970, 225, 657-658

5) RYTÖMAA T. and KIVINIEMI K., *Cell Tissue Kinetics*, 1968, 1, 329-340

6) TYTÖMAA T. and KIVINIEMI K., *Cell Tissue Kinetics*, 1968, 1, 341-350

7) PAUKOVITS W.R., *Cell Tissue Kinetics* , 1971, 4, 539-547

8) MOORHEAD J.F., PARASKOVA-TCHERNOZENSKA E., PIRRIE A.J. and HAYES C., *Nature*, 1969, 224, 1207-1208

9) JONES J., PARASKOVA-TCHERNOZENSKA E. and MOORHEAD J.F., *Lancet*, 1970, 654

0) GARCIA-GIRALT E., LASALVIA E., FLORENTIN J. and MATHE G., *European J. Clin. Biol. Res.*, 1970, 15, 1012-1015

1) SAETREN H., *Exp. Cell Res.*, 1956, 11, 229-232

2) VERLY W.G., DESCHAMPS Y., PUSHPATADAM J. and DESROSIERS M., *Can. J. Biochem.* , 1971, 49, n° 12, 1376-1383

3) SIMARD A., CORNEILLE L., DESCHAMPS Y. and VERLY W.G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 75, n° 1, 1763-1766

4) MENZIES R.A. and KERRIGAN J.M., *Exptl. Cell Res.*, 1974, 86, 430-433

5) HOUCK J.C. and DOUGHERTY W.F., *Medcom Medical Uptake series, Medcom Press*, 1974, 1-54

6) LOZZIO B.B., LOZZIO C.B., BAMBERGER E.G. and LAIR S.V., *International Review of Cytology*, 1975, 42, 1-47

7) HENDERSON I.W.D., *J. of Surgical Oncology* , 1970, 2, (3), 221-229

8) CHANY E. and FRAYSSINET C., *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1971, 272, Série D, 2644-2647

9) AUJARD C., CHANY E. and FRAYSSINET C., *Exp. Cell Res.*, 1973, 78, 476

0) SPIELHOFF R., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1971, 138, 43-46

1) VOLM M., MATTERN J. and WAYSS K., *Exp. Path. Bd.*, 1972, 7, 84-87

2) WAYSS K., MATTERN J. and VOLM M., *Die Naturwissenschaften* , 1973, 60, Heft. 7, 354-355

3) PLAS. C., *C.R. Acad. Sc. Paris* , 1969, 268, Série D, 143-146

4) LAMBIOTTE M., VORBRODT A. and BENEDETTI E.L., *Cell Differenciation* , 1973, 2, 43-53

5) HIGGINS G.M. and ANDERSON R.M., *Arch. Pathol.* , 1931, 12, 186

6) NADAL C., *Cell Tissue Kinet.*, 1973, 6, 437-446

7) FRIEDKIN M., TILSON D. and ROBERTS, *J. Biol. Chem.*, 1956, 220, 627-638

8) FRIEDKIN M. and WOOD H., *J. Biol. Chem.* , 1956, 220, 639

9) SCHMIDT G. and THANNHAUSER S.J., *J. Biol. Chem.*, 1945, 161, 83

0) SCHNEIDER W.C., *J. Biol. Chem.* , 1946, 164, 747-751

1) SCHNEIDER W.C. and GRECO A.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 610-626

2) MORLEY C.G. and KINGDON H.S., *Anal. Biochem.* , 1972, 298-305

3) THOMAS E.D., COLLINS J.A., KASAKURA S. and FERREBEE, *Transplantation*, 1963, 1, 514

4) GOLDSPINK D.F. and GOLDBERG A.L., *Biochim. Biophys. Acta* , 1973, 299, 521-532

5) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., LEWIS-FARR A. and RANDALL R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275

6) BURTON K., *Biochem. J.*, 1956, 62, 315-323

7) MEJBAUM W.S., *Z. Physiol. Chem.*, 1939, 258, 117

8) BRAY G.A., *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 279-285

9) KOCH J. and STOCKSTAD E.L.R., *Eur. J. Biochem.*, 1967, 3, 1

0) CHANG L.O. and LOONEY W.B., *Cancer Res.*, 1965, 25, 1815-1822

1) CRAIG L.C., *Techniques for the study of Peptides and Proteins by Dialysis and Diffusion* in *Methods in Enzymology*, 1967, Vol. XI, 870-905

2) FLORENTIN I., BRULEY M. and BELPOMME D., *Cellular Immunology*, sous presse

3) DUBBS D.R. and KIT S., *Exp. Cell Res.*, 1964, 33, 19

4) DESCHAMPS Y. and VERLY W.G., *Biomedicine* , 1975, 22, 195-208

DEUXIEME PARTIE

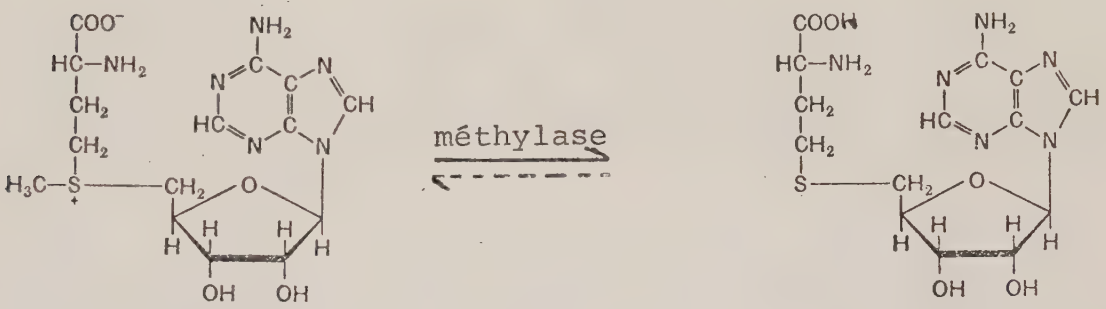
EFFET D'ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA L SAH SUR LA TRANSFORMATION DE FIBROBLASTES D'EMBRYON DE POULET PAR LE VIRUS DU SARCOME DE ROUS

- INTRODUCTION -

I - METHYLATION ET CARCINOGENESE

Le rôle probable des méthylations enzymatiques des acides nucléiques a été suggéré par Srinivasan et Borek (1),(2),(3). D'après leur hypothèse, ces méthylases agiraient comme des agents carcinogènes chimiques alkylants en introduisant des groupements méthyles en des sites bien définis dans les nucléosides d'acides nucléiques préformés.

Le schéma global d'une méthylation peut se formuler ainsi :



S-adenosylmethionine.

S-adenosylhomocysteine

+ substrat

+ substrat méthylé

La réaction laisse supposer qu'il existe deux sites distincts et spécifiques sur l'enzyme : un site pour la SAM et un site pour le substrat à méthyler. La SAM ou "méthionine activée" est synthétisée à partir de l'ATP et de la L méthionine par une SAM synthétase (4).

La conséquence de l'hyperméthylation serait le changement de conformation de la molécule suivi d'aberrations dans son fonctionnement.

L'hypothèse de Borek repose sur les observations de Bergquist et Mathews (5) et sur les résultats obtenus par Farber et Magee (6),(7) : les uns ont constaté que certaines tumeurs contiennent de l'ARN_t méthylé à un taux plus élevé que le tissu normal correspondant ; les autres ont montré sur des rats que des agents carcinogènes comme l'éthionine et la diméthyl nitrosamine méthylent l'ARN du foie lorsqu'ils sont administrés aux animaux.

.../...

L'hypothèse a été élargie de façon à inclure la carcinogénèse viro-induite (8) : "Nous avons postulé que, si tous les enzymes méthylant les acides nucléiques sont spécifiques de l'espèce, un virus oncogène pourrait introduire la capacité de synthétiser des enzymes méthylant les acides nucléiques, lesquelles enzymes seraient étrangères à l'hôte. Si c'était le cas, l'hôte se trouverait alors en possession d'enzymes qui méthyleraient ses acides nucléiques d'une façon aberrante, de la même façon que les carcinogènes alkylants".

Depuis, des travaux ont montré que dans de nombreux cas, le taux d'ARN_t-méthylases était plus important dans des tissus cancéreux que dans les tissus normaux correspondants : C'est le cas par exemple de tumeurs mammaires humaines et d'un hépatome de souris (9), de tumeurs viro-induites chez le hamster (10),(11) et de tumeurs hépatiques chez des poulets atteints de la maladie de Marek (12),(13).

Parmi ces travaux, ceux de Mc Farlane et Shaw (10) sont intéressants dans la mesure où ils montrent que l'activité ARN_t-méthylasique est plus importante dans les tissus tumoraux du hamster transformés par l'adénovirus 12 que dans les tissus normaux mais aussi parce qu'ils ne trouvent pas de différence en ce qui concerne les sites de méthylation dans les deux cas.

Cependant, Kit et al. (14), tout en confirmant les observations de Mittelman et al. (11) sur des cellules de rein transformées par le virus SV-40, ne constatent pas de différence entre l'activité ARN_t-méthylasique des cellules normales et celle de cellules infectées par le virus SV-40, par le virus de la vaccine ou par le virus de l'herpès.

Breier et Holley (15) quant à eux ne trouvent pas de différence tant qualitative que quantitative dans la méthylation de l'ARN_t en comparant cinq lignées cellulaires transformées ou non par le virus du polyome. Deux autres équipes trouvent des résultats similaires (16),(17). Ho et al. (18) comparent la méthylation de l'ARN_t dans un hépatome humain et ne trouvent aucune différence avec le tissu normal.

Klagsbrun (19) étudiant une lignée cellulaire de souris, constate que la transformation de celle-ci par le virus SV-40 augmente l'activité et la capacité de méthylation de l'ARN_t "in vitro". Cependant, un marquage des cellules par de la L méthionine (méthyl C^{14}) montre que l'étendue de la méthylation et la composition en bases méthylées est la même dans les cellules normales et dans les cellules transformées.

II - EXISTENCE D'EFFECTEURS NATURELS DES METHYLASES

L'hypothèse de Borek est controversée, d'autant plus que les conditions de dosage "in vitro" diffèrent selon les auteurs : les uns utilisent des extraits bruts, d'autres des extraits dialysés. Or dans ces extraits, on a trouvé des effecteurs de l'activité méthylasique.

.../...

Rudeh et al. (20) puis Kaye et Leboy (16) ont montré que l'ion ammonium, à une concentration non physiologique (0,32 M), stimule l'activité ARN_t-méthylasique, tant dans les extraits de tissus normaux que cancéreux ou en régénération.

Plus tard, Leboy (21) puis Pegg (22) montrent que des polyamines à une concentration physiologique ont un effet analogue à l'ion ammonium. Or ces amines sont présentes dans les tissus et leur concentration augmente lorsque le tissu se trouve dans une période de croissance rapide, que la cause soit pathologique ou non (23),(32).

Par conséquent, on peut se demander si ce n'est pas plutôt le taux élevé de polyamines dans les tissus en état de prolifération — et en particulier dans le tissu cancéreux — qui stimulerait l'activité méthylasique, le taux d'enzyme étant le même dans les cellules normales ou cancéreuses.

La présence de polyamines dans les extraits expliquerait alors les résultats obtenus par Gallo et son équipe (33),(36) : ceux-ci ne trouvent aucune différence dans l'activité ARN_t-méthylasique entre des cultures de lymphoblastes normaux ou leucémiques, si les conditions de croissance sont identiques (en ce qui concerne notamment la vitesse de croissance et le degré de différentiation). D'autre part, ils ne notent pas non plus de différence entre des leucocytes normaux ou leucémiques ; par contre, ils constatent une augmentation de l'activité ARN_t-méthylasique entre le stade "lymphoblaste" (lymphocyte non différencié) et le stade "leucocyte" (lymphocyte différencié) des globules blancs. D'autre part, ils observent qu'en ajoutant un mitogène — la phytohémagglutinine — ils stimulent l'activité méthylasique dans les leucocytes leucémiques.

Ils étudient ensuite des systèmes oncogènes induits par un virus à ARN et un virus à ADN tant "in vivo" qu'"in vitro" : leurs résultats montrent qu'il n'y a pas de différence "in vitro" entre les cellules normales ou transformées et qu'"in vivo", la différence semble uniquement liée à l'état prolifératif de l'organe témoin.

Outre cette stimulation par les polyamines, Kerr a proposé un autre mode de régulation de l'activité méthylasique (37), (41) : une enzyme méthylerait l'azote de la glycine, en présence de SAM, pour donner la sarcosine et la SAH. Ce dernier produit aurait une affinité plus grande pour les ARN_t-méthylases que pour la glycine-méthylase. Cette glycine-méthylase semble présente dans les tissus n'étant pas dans un état prolifératif ; son activité baisserait ou disparaitrait dans les tissus tumoraux ou foetaux. Kerr postule donc que la glycine-méthylase régule les niveaux relatifs de la SAM et de la SAH. Ceci est confirmé par Glick et al. (40).

On ne peut donc pas affirmer actuellement que les méthylations aberrantes des acides nucléiques sont responsables de la carcinogénèse. Elles peuvent être aussi une conséquence de processus plus complexes liés à l'état prolifératif des cellules.

.../...

III - HYPOTHESE DE TRAVAIL

La L SAH qui est un des produits de la réaction de méthylation, se révèle être l'inhibiteur naturel et potentiel des méthylases (43),(44). Plusieurs laboratoires ont synthétisé des analogues structuraux et étudié leur activité sur différents systèmes enzymatiques (45 - 54).

A l'I.C.S.N., Hildesheim et al. (46),(47) ont synthétisé plusieurs analogues structuraux de la L SAH et ont trouvé qu'ils inhibent "in vitro" les méthylases d'un extrait brut de foie de lapin, en utilisant comme substrat de l'ARN_t d'E. Coli (55 - 57). Dans ces expériences, la L SAH a toujours été plus active que ses analogues synthétiques.

On peut imaginer que si une forte activité méthylasique est en relation avec l'état cancéreux des cellules, la présence de la SAH, ou plutôt d'analogues structuraux moins faciles à dégrader, devrait interférer avec l'expression du phénotype transformé.

Nous avons donc voulu savoir si parmi les analogues synthétisés à Gif par Hildesheim et al., il y en avait qui pouvaient agir sur la transformation oncogène viro-induite de cellules encaryotes. Pour cette étude, nous avons choisi comme modèle la transformation des fibroblastes d'embryons de poulet (FEP) par le virus du sarcome de Rous (VSR).

.../...

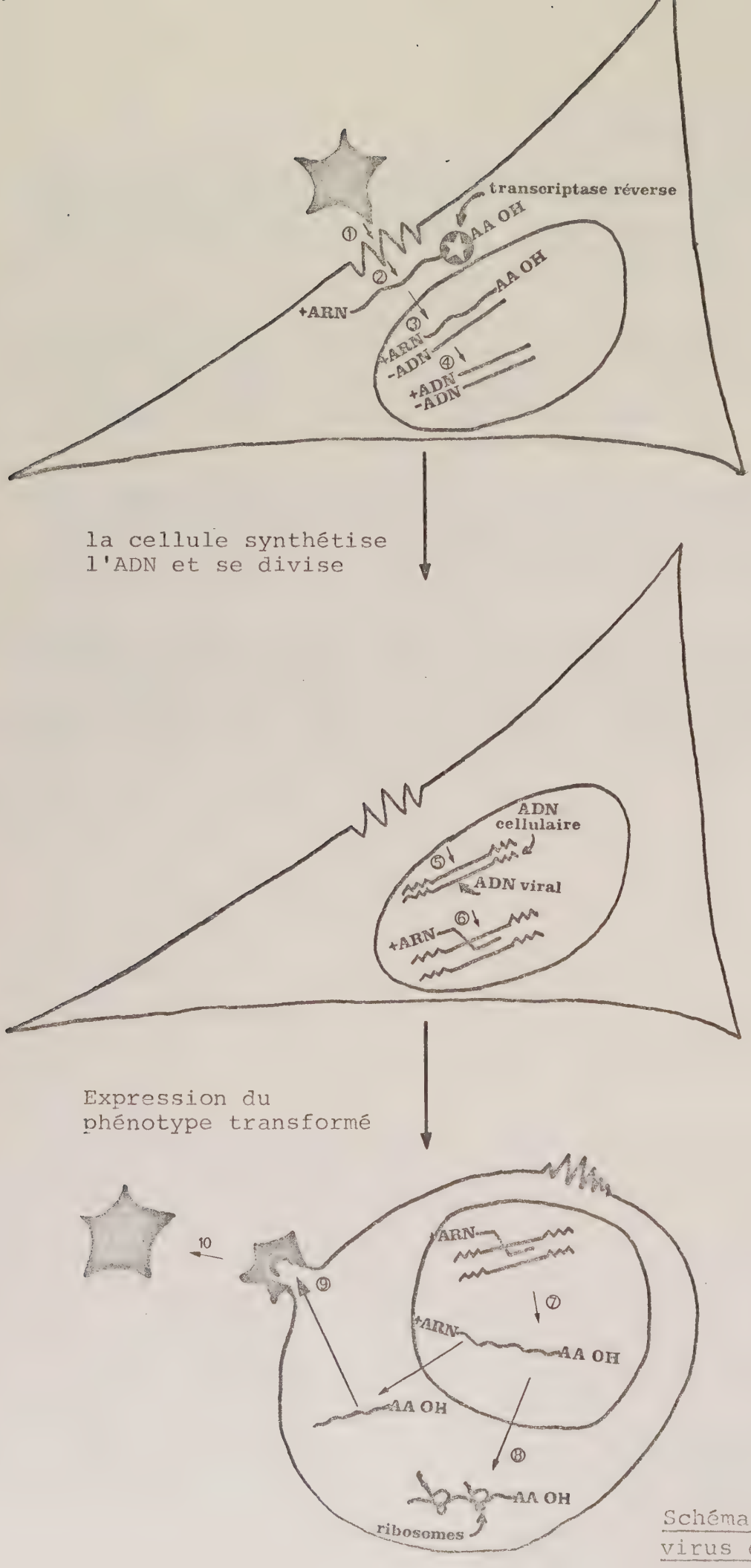


Figure 0.1

Schéma du cycle de vie d'un virus oncogène à ARN

La figure 0.1 illustre schématiquement le cycle de vie d'un virus oncogène à ARN.

① Les virions infectieux se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques, pénétrent dans la cellule et ② sont débarrassés de leur coque dans le cytoplasme tout en se dirigeant vers le noyau.

③ La transcriptase réverse virale utilise l'ARN viral 60-70 S et les amorceurs endogènes pour synthétiser une chaîne d'ADN complémentaire (58) et ④ une chaîne d'ADN dont la séquence des bases est la même que celle de l'ARN viral (59).

⑤ Le double brin d'ADN viral ou provirus est intégré par un mécanisme inconnu dans l'ADN de la cellule hôte. On ne sait pas si cette étape a lieu avant ou après la division cellulaire.

⑥ La transcription du provirus est initiée après la division cellulaire. On ne sait pas si l'initiation de la transcription dépend directement ou indirectement de la division cellulaire.

⑦ Les produits de transcription du provirus vont dans le cytoplasme où ils se comportent tout d'abord comme ARN messagers pour réaliser la synthèse des protéines virales ⑧. Lorsque la concentration de protéines virales augmente, des molécules d'ARN viral sont enfermées dans des particules en voie de maturation soit directement ⑨ , soit après avoir joué le rôle d'un ARN messager.

Les virions en voie de maturation se dirigent vers la surface de la cellule d'où ils bourgeonnent en acquérant une enveloppe externe ⑩ . Il est probable que d'autres étapes de maturation se produisent dans les particules extracellulaires. Les cellules infectées acquièrent un phénotype transformé après qu'elles se soient divisées et que la transcription du provirus ait commencé.

La transformation cellulaire se traduit par la formation "in vivo",

- de sarcomes dans le tissu sous-cutané de jeunes poulets,
- de tumeurs sur la membrane chorioallantoïque d'embryons de poulet,

et dans les cultures de fibroblastes d'embryons de poulet, de foyers de cellules rondes, caractéristiques de l'état transformé, les cellules non transformées étant au contraire très allongées. Ces effets peuvent tous être utilisés pour tester et caractériser la présence du virus. Cependant, la formation de foyers en culture est préférable car elle est pratique, reproductible et reflète la teneur en virus transformant.

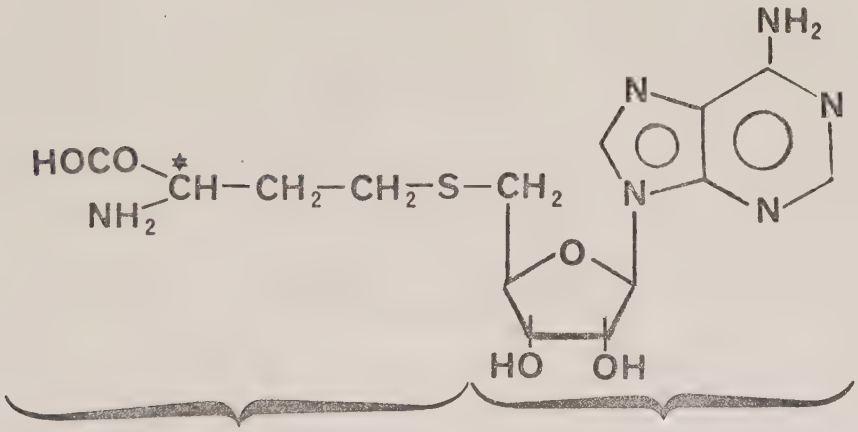
- CHAPITRE I -

Etude comparée d'analogues structuraux synthétiques de la SAH sur la croissance de fibroblastes d'embryons de poulet et leur transformation par le virus du Sarcome de Rous

Parmi les analogues structuraux synthétisés par Hildesheim et son équipe, nous avons d'abord recherché ceux qui pourraient avoir un effet réversible sur la croissance des FEP et un effet irréversible sur leur transformation induite par le VSR.

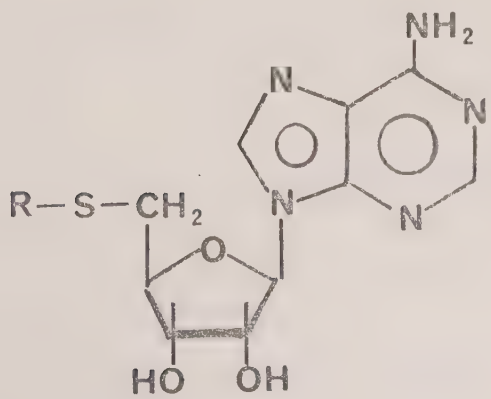
I - ANALOGUES STRUCTURAUX SYNTHETIQUES ETUDIES

La 5' S Adénosyl L homocystéine a pour formule :



L homocystéine — 5' adénosyl

Les analogues structuraux ont une formule du type :

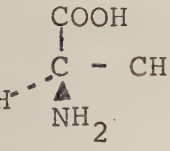
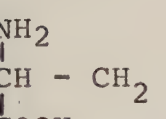
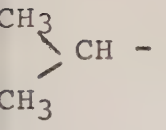
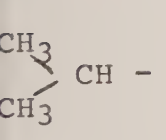
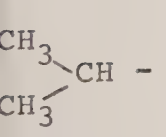
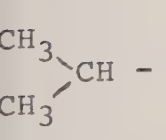
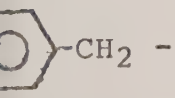


où R est le radical modifié (Tableau I-1)

.../...

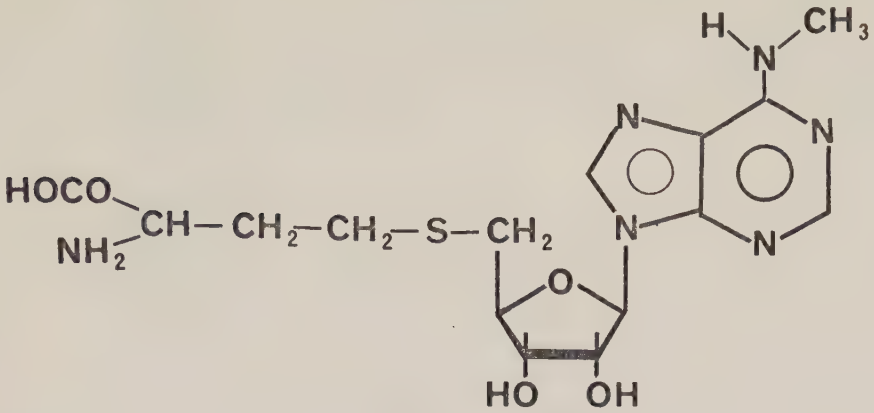
TABLEAU I-1

Analogues structuraux synthétiques de la SAH étudiés

R -	Nom du produit	Abréviation	Synthèse (référence)
	5' S-Adénosyl D homocystéine	D SAH	(64)
	5' S-Adénosyl cystéine	SAC	(46)
$NH_2 - CH_2 - CH_2 - S -$	5' S-Adénosyl cystéamine	SACN	(47)
$HO - CH_2 - CH_2 - S -$	5' S-Adénosyl mercaptoethanol	SAMe	(65)
$CH_3 - S -$	Sulfure de méthyl et de 5' Adénosyle	SMA	(66)
$CH_3 - CH_3 - CH_2 - S -$	Sulfure de n-propyle et de 5' Adénosyle	SPA	(67)
$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-S-$	Sulfure n-butyle et de 5' Adénosyle	SBA	(47)
	Sulfure d'Isobutyle et de 5' Adénosyle	SIBA	(46) (47)
	Isobutyl -méthyl -5' Adénosyl-sulfonium	SIBA méthyl sulfonium	(68)
	Isobutyl-5' Adénosyl-sulfoxyde	SIBA sulfoxyde	(69)
	Isobutyl-5' Adénosyl-sulfone	SIBA sulfone	(70)
$CH_3-(CH_2)_5-CH_2-S-$	Sulfure d'heptyle et de 5' Adénosyle	SHA	(68)
	Sulfure de Benzyle et de 5' Adénosyle	S Benz.A.	(67)

La plupart des analogues dont R est un groupement aliphatique ou aromatique, ont une solubilité maximale de 10^{-2}M à 80°C.

Outre, ces produits, la 5'S Adénosyl L homocystéine N_6 méthyle (L SAH N_6 méthyle) (57), a été testée.



SAH N_6 méthyle

II - MATERIEL ET METHODES

A) Cultures

Des cultures secondaires de FEP sont préparées et cultivées dans des boîtes Falcon de 3 cm de diamètre selon la méthode décrite par Vigier et al. (60),(61), dans du milieu F_{10} de Ham (Gibco) (62), additionné de 5 % de sérum de veau (Eurobio), de glutamine (1 mM) (Gibco) et d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Kanamycine et Fungizone). La croissance des FEP est déterminée par comptage des cellules à l'aide d'un hématimètre, après leur décollement par de la trypsine (Difco) à 0,12 % dans du PBS sans calcium ni magnésium.

Les produits à tester sont dissouts dans le milieu de culture et stérilisés par filtration sur un filtre millipore. Le virus utilisé est un clône (SR_4) isolé de la souche Schmidt-Ruppin du VSR, type D.

B) Inhibition de la croissance des FEP normaux

Des cultures secondaires de FEP sont ensemencées à environ $0,5.10^6$ - $0,6.10^6$ cellules par boîte. Au bout de 24 heures, les cellules sont comptées. On ajoute alors l'inhibiteur à tester et on le laisse en contact pendant 24 heures ou 48 heures avec les cellules. Celles-ci sont ensuite comptées et on change le milieu par un milieu sans inhibiteur. 2 ou 3 jours plus tard, on compte de nouveau les cellules ; on considère qu'il y a réversion quand le nombre de cellules a doublé.

.../...

C) Inhibition de la transformation cellulaire

Des cultures secondaires de FEP sont ensemencées à raison de 0,5 à 0,6.10^6 cellules par boîte dans du milieu F_{10} de Ham ; on les infecte un jour plus tard avec 100 u.f.f. (unités de formation de foyers) de VSR ; après adsorption du virus pendant une heure à 37°C, on recouvre les cellules avec 0,75 ml d'agar (Difco) ; les produits à tester, dans 1,5 ml de milieu, sont ajoutés au dessus du gel d'agar.

Les cultures témoins sont faites dans du milieu sans inhibiteur. Après un ou deux jours de contact, le surnageant contenant les analogues est remplacé par du milieu de culture normal composé de milieu Eagle-MEM à concentration double en acides aminés, avec 5 % de sérum de veau, 5 % de Bacto tryptose phosphate (Difco) et d'antibiotiques. Les foyers de cellules transformées sont comptés 8 à 9 jours après l'infection.

D) Préparation d'extraits acellulaires

Les extraits sont faits à 4°C. Le tapis cellulaire des boîtes est rincé avec du PBS puis récupéré dans 2 ml de tampon contenant du TRIS-HCl 10 mM pH8, du β-mercapto-éthanol 10 mM et du Mg Cl_2 10 mM. Les cellules sont broyées au Potter et les noyaux, les mitochondries et les membranes sont éliminés par centrifugation 15 minutes à 12000 g. On dose l'activité ARN_t-méthylasique avant et après dialyse contre le même tampon avec de l'EDTA 0,1 mM et du glycérol à 10 %.

E) Dosage de l'activité ARN_t-méthylasique

L'activité ARN_t-méthylasique est déterminée dans un volume de 0,1 ml ; le milieu réactionnel contient : TRIS-HCl 50 mM pH 8, Mg Cl_2 10 mM, SAM Méthyl C^{14} (CEA Saclay) 0,1 mM, dont l'activité spécifique est 50 mCi/mmole, β mercaptoéthanol 10 mM, de l'ARN_t d'*E. Coli* B 100 µg, de l'acétate d'ammonium 0,25 M et des quantités variables d'extrait acellulaire allant de 0 à 300 µg en protéines.

Après 60 minutes d'incubation à 30°C, on arrête la réaction en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique (ATC) à 5 %. Le précipité est recueilli sur filtres de verre (GF/C, Whatman), rincé à l'ATC à 5 % et sa radioactivité est dosée dans un compteur à scintillation liquide "Inter-technique". Les blancs, sans ARN_t, sont traités de la même façon.

L'activité ARN_t-méthylasique est exprimée en pmoles de groupes méthyl-C^{14} incorporés par mg de protéines de l'extrait à 30°C en 60 minutes pour 100 µg d'ARNt.

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry (63) en utilisant de la sérum albumine bovine (Serva) comme étalon.

.../...

III - ACTION D'ANALOGUES STRUCTURAUX SYNTHETIQUES DE LA SAH

A) Action sur la croissance des cellules normales

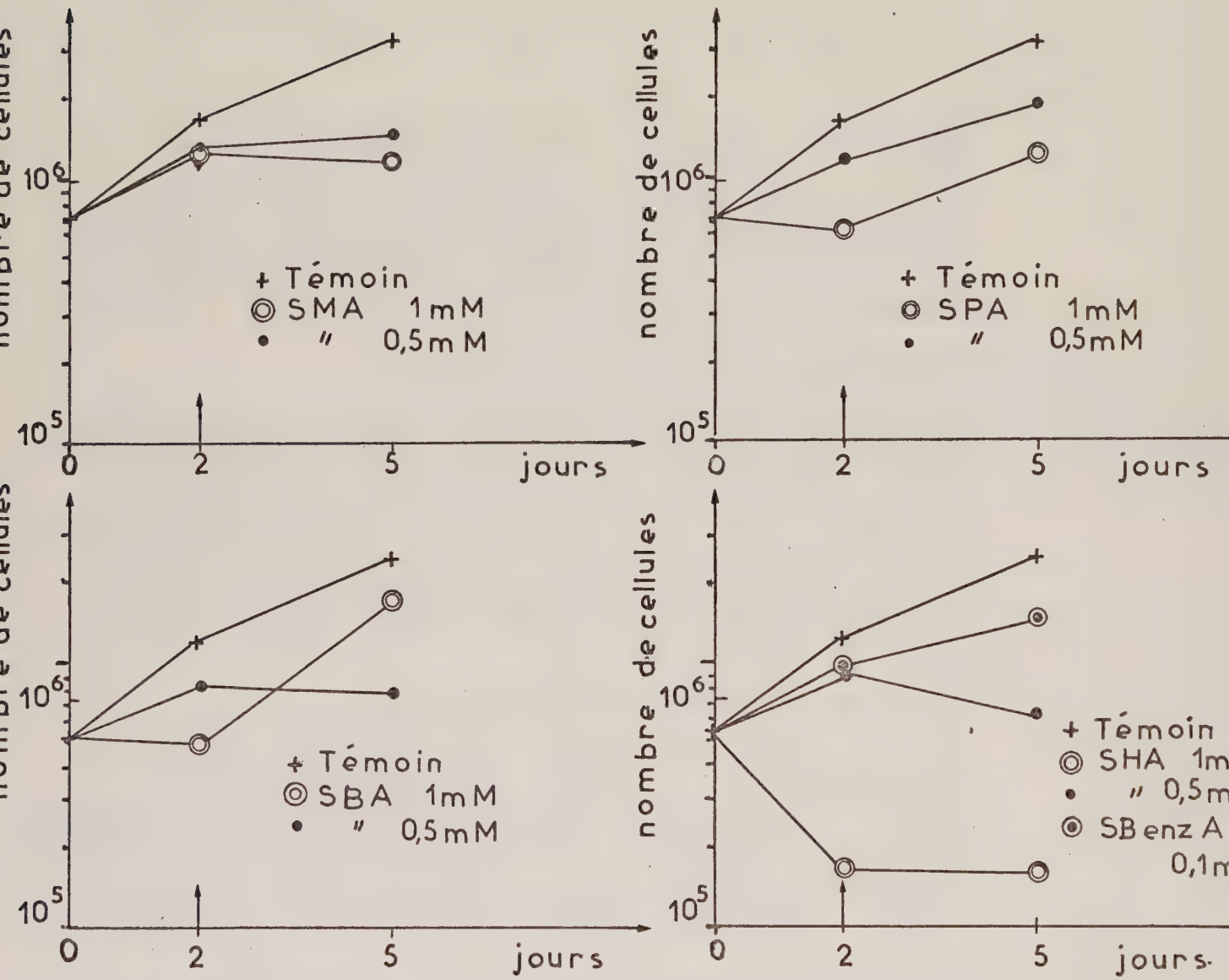


fig. I-1 (1ère partie)

Le Tableau I-2 et la figure I-1 montrent l'action de chaque produit après 48 heures d'incubation avec les cellules, ainsi que la réversibilité de l'effet.

.../...

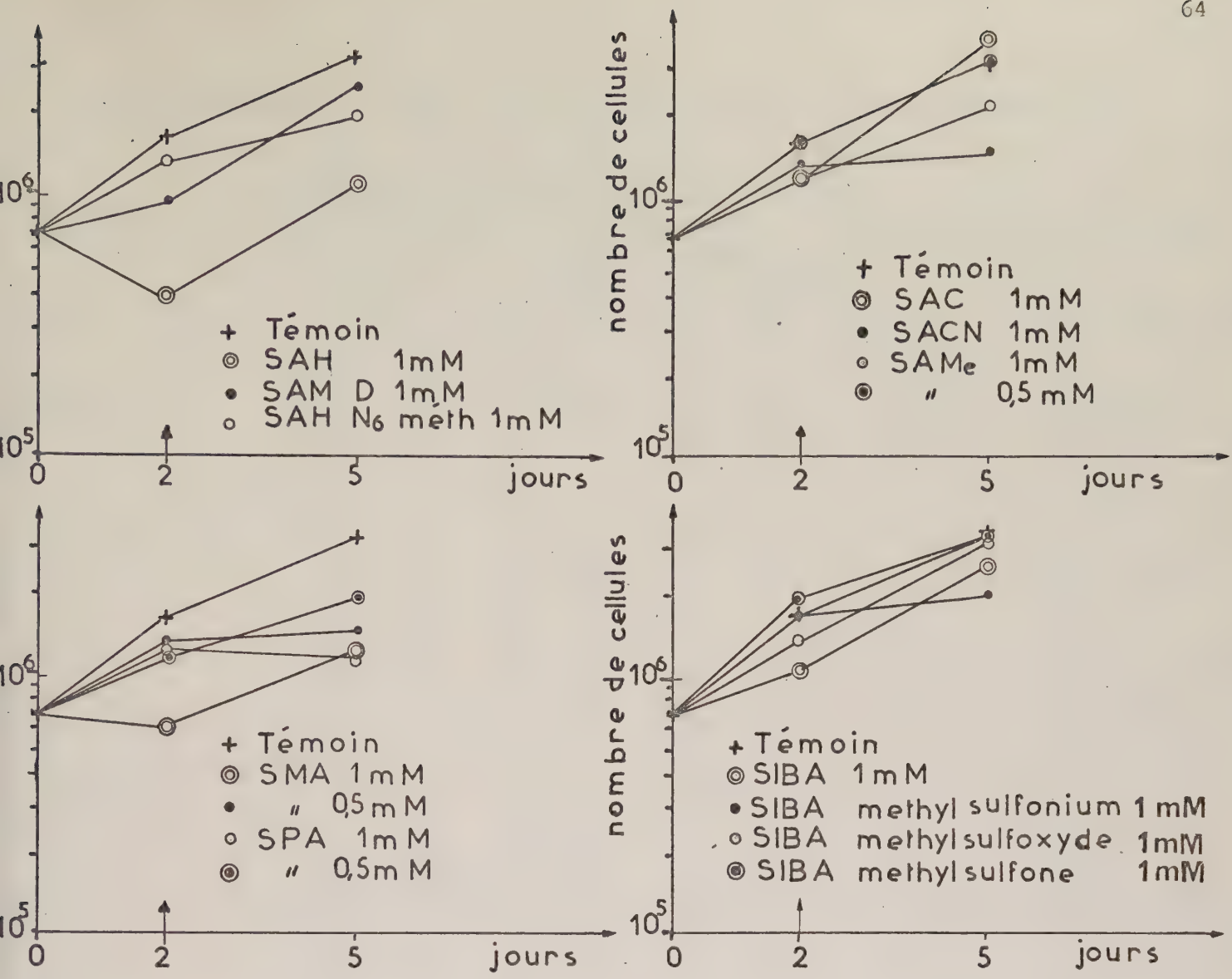


fig. I-1 (2 ème partie)

Les produits dont le radical R est de nature aliphatique sont les plus actifs comme inhibiteurs de la croissance ; toute modification de la fonction thioéther provoque la diminution ou la perte de cette inhibition. Il faut noter des effets toxiques de la SMA et de la SHA ; la SHA N_6 méthyle, la SIBA méthyl sulfonium et la S Benz A présentent un retard d'inhibition qui pourrait révéler une toxicité latente de la molécule ou de son produit de dégradation.

.../...

- TABLEAU I-2 -

Action d'analogues structuraux de la SAH sur la croissance de FEP

Analogue testé	Concentration (mM)	Nombre de cellules x10^6 au temps t = 0	Nombre de cellules x 10^6 au temps t = 48 h.	% d'inhibition (Témoin-Essai) / Témoin x 100	Nombre de cellules x10^6 après 3 jours de réversion	Observations
L SAH	1	0,74	0,41	76 %	1,15	Réversible
D SAH	1		0,95	44 %	2,72	Réversible
SAH H^6 méthyle	1		1,39	18 %	2,32	Léger retard d'inhibition toxique
SAC	1		1,26	26 %	4,45	Réversible
SACN	1		1,39	18 %	1,61	Non réversible
SAMe	1		1,26	26 %	2,33	Réversible
SAMe	0,5		1,70	0 %	3,7	Sans action
SMA	1		1,31	23 %	1,2	Toxique
SMA	0,5		1,37	19 %	1,54	Non réversible
SPA	1		0,66	61 %	1,28	Réversible
SPA	0,5		1,21	29 %	2,06	Réversible
SBA	0,5		1,15	32 %	1,06	Non réversible
SIBA	1		0,51	70 %	2,8	Réversible
SIBA Méthyl sulfonium	1		1,70	0 %	2,23	Toxique
SIBA sulfoxyde	1		1,45	15 %	3,33	Réversible
SIBA sulfone	1		2,04	20 %	3,54	Sans action
SHA	1		0,17	90 %	0,16	Non réversible
SHA	0,5		1,28	21 %	0,88	Toxique
S Benz A	0,1		1,33	22 %	1,99	Non réversible
Témoin			1,7		3,7	

.../...

TABLEAU I-3

Action d'analogues structuraux de la SAH sur la formation de foyers de cellules transformées par le VSR

Analogue testé	Concentration (mM)	Lecture 8 jours[X] ou 9 jours[XXX] après l'infection	
		24 heures de contact avec le produit	48 heures de contact avec le produit
L SAH	1		20 %[X]
D SAH	1		0 %[XXX]
SAH N_6 méthyle	1		0 %[XXX]
SAC	1		76 %[X] 75 %[XXX]
SACN	1		87 %[X]
SAMe	1		96 %[X] 95 %[XXX]
SAMe	0,5		88 %[X] 85 %[XXX]
SMA	1	Cellules mortes, pas de foyers, toxique	
SMA	0,5	70 %[X] 70 %[XXX]	100 %[X] 100 %[XXX]
SPA	1	Cellules mortes, toxique	
SPA	0,5		86 %[X] 82 %[XXX]
SBA	1		100 %[X]
SBA	0,5	81 %[X] 62 %[X]	91 %[X] 86 %[XXX]
SIBA	1		100 %[X] 96 %[XXX]
SIBA	0,1		24 %[X]
SIBA méthyl sulfonium	1		12 %[X]
SIBA sulfoxyde	1		75 %[X] 75 %[XXX]
SIBA sulfone	1		0 %[X]
SHA	1	Cellules mortes, toxique	
SHA	0,5	Toxique	
SHA	0.1	66 %[X]	57 %[X]
S BENZ A	1	Cellules mortes, pas de foyers, toxique	
S BENZ A	0,5	Cellules mortes, pas de foyers, toxique	
S BENZ A	0,1	55 %[X]	68 %[X]

B) Action sur la transformation des cellules

Le Tableau I-3 montre l'inhibition, par chaque analogue structural, de la formation de foyers de cellules transformées. On constate, comme pour la croissance des cellules normales, que les analogues dont le radical est de nature aliphatique sont les meilleurs inhibiteurs et que toute modification de la fonction thioéther abaisse l'inhibition. D'ores et déjà, il convient de noter qu'au-delà d'une certaine longueur de chaîne, le produit se révèle toxique. C'est ainsi que la SHA et la S Benz A sont toxiques sur les cellules transformées.

Les produits qui semblent bloquer la formation des foyers sans montrer d'effet cytotoxique notable, sont :

la SAMe, la SBA, la SIBA, la SMA et la SPA.

On peut essayer d'esquisser le profil d'un produit agissant sélectivement sur les cellules transformées. Si on considère la longueur des radicaux aliphatiques, on constate que les produits les plus actifs ont une longueur de R de 3 à 4 carbones (SIBA et SPA) ; en dessous, le produit est cytotoxique à 1 mM (SMA) ; au dessus, le produit est également cytotoxique (SBA, SHA, S Benz A).

La fonction thioéther semble indispensable à l'activité. L'apparition d'un groupement polaire en bout de chaîne réduit la toxicité du produit. Si la longueur de la chaîne est du même ordre que celle de la SIBA, ou de la SPA, le produit atteint quasiment la même activité sinon, il perd son efficacité. Enfin, une modification apportée au cycle semble rendre le produit inactif.

C) Action sur l'activité méthylasique dans des extraits de FEP normaux ou transformés par le VSR

Nous avons ensuite comparé l'action de certains de ces analogues structuraux de la SAH sur la méthylation des ARN_t d'E. Coli par un extrait de cellules normales ou transformées par le VSR.

L'activité spécifique est de 116 pmoles pour les cellules normales et de 174 pmoles pour les cellules transformées.

Le Tableau I-4 montre qu'en général tous ces analogues sont de médiocres inhibiteurs de cette activité ARN_t-méthylasique, comparés à la L SAH.

.../...

TABLEAU I-4

Effets d'analogues structuraux de la SAH sur des méthylases dans des extraits de FEP, normaux ou transformés par le VSR

Analogue testé	Méthylation de l'ARN_t Ki (µM)		Méthylation des protéines endogènes de l'extrait Ki (µM)	
	Cellules normales	Cellules transformées	Cellules normales	Cellules transformées
SAHL	1,5	3,5	500	170
SAC	680	900	688	1.000
SIBA	3.600	3.000	non mesurable	10.000
SAMe	5.160	16.850	2.500	5.000
SMA	13.200	32.200	non mesurable	5.000
SPA	>100.000	non mesurable	non mesurable	10.000

LEGENDE : La constante d'inhibition Ki, est calculée d'après la formule valable pour l'inhibition compétitive :

$$Ki = \frac{[I]}{(\frac{K'}{Km} - 1)}$$

où $[I]$ = concentration de l'inhibiteur
K' = Km apparent
Km = constante de Michaelis

Le Km de la SAM est de 5,5 µM pour les cellules normales, et de 5,6 µM pour les cellules transformées.

Les analogues structuraux sont classés par ordre décroissant d'inhibition.

Si l'on compare l'inhibition de l'activité ARN_t méthylasique des cellules normales à celle des cellules transformées, on constate que seule la SIBA inhibe un peu plus l'activité ARN_t méthylasique des cellules transformées que des cellules normales. Dans les autres cas étudiés, c'est la situation inverse qui a lieu.

.../...

Tous ces produits sont des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de la SAM. On constate que les meilleurs inhibiteurs parmi tous ces analogues structuraux sont la SAC et la SIBA ; or, nous avons vu (Tableaux I-2 et I-3) que ces deux produits ne sont pas cytotoxiques, qu'ils freinent la croissance des FEP d'une façon réversible et qu'ils empêchent la transformation viro-induite.

On remarque que, par les analogues étudiés, la SIBA est le meilleur inhibiteur de la transformation puisque à la concentration de 1 mM elle inhibe à 100 % la formation des foyers, alors que la SAC n'inhibe pas d'une façon absolue à la même concentration.

C'est pourquoi nous avons choisi la SIBA afin d'étudier la relation entre la transformation et les méthylations.

- CHAPITRE II -

Action comparée de la L SAH et de la SIBA sur des FEP normaux ou transformés par le VSR

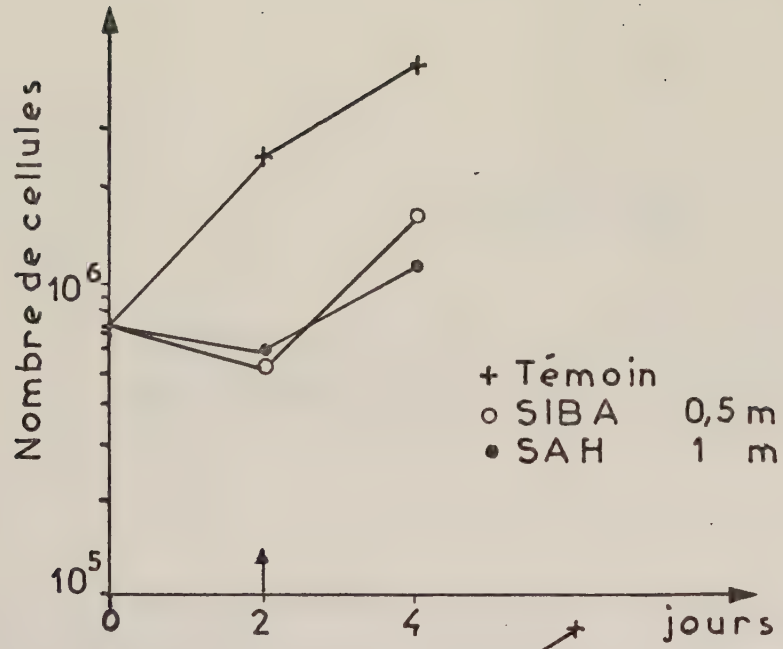
La SIBA est un analogue structural de la SAH et semble agir sur la transformation ; nous avons donc voulu approfondir et comparer l'action de ces deux produits sur la croissance de FEP normaux, sur leur transformation par le VSR et sur la production virale par les cellules transformées.

I - EFFETS SUR LA CROISSANCE DES FEP

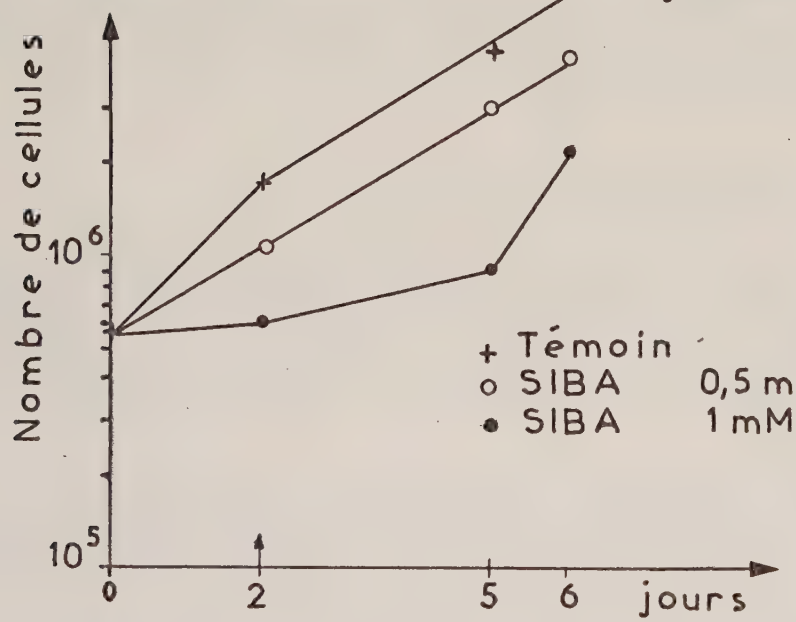
Les résultats préliminaires du Chapitre I (Tableau I-1, figure I-1) nous ont montré que la L SAH 1 mM et la SIBA 1 mM inhibent toutes les deux à environ 70 % la croissance des FEP normaux après 48 heures de contact. Dans les deux cas, cette action était réversible après 48 heures de séjour en milieu normal.

Le Tableau II-1 a) et la figure II-1 a) montrent qu'il en est de même pour la SIBA 0,5 mM comparée à la L SAH 1 mM ; par contre, le Tableau II-1 b et la figure II-1 b suggèrent que la SIBA 0,1 mM inhibe la croissance des FEP à 40 % contre 70 %, pour la SIBA 1 mM. Il doit exister un seuil au delà duquel l'inhibition n'est plus proportionnelle à la concentration en SIBA. Ce seuil doit se trouver entre 0,1 mM et 0,5 mM.

.../...

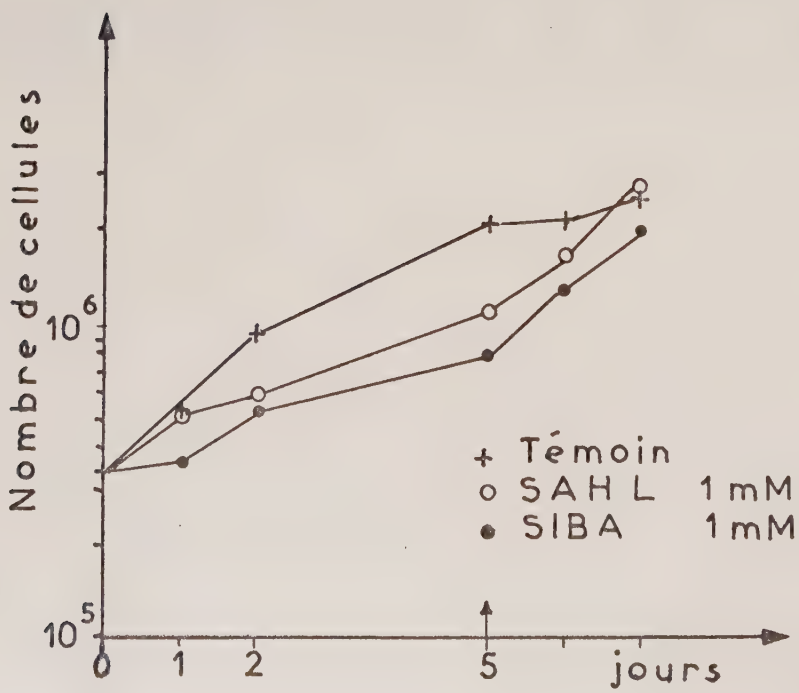

Nombre de cellules
10^6
10^5
+ Témoin
o SIBA 0,5 mM
• SAH 1 mM
0
2
4
jours

a)


Nombre de cellules
10^6
10^5
+ Témoin
o SIBA 0,5 mM
• SIBA 1 mM
0
2
5
6
jours

b)

fig. II-1


Nombre de cellules
10^6
10^5
+ Témoin
o SAH L 1 mM
• SIBA 1 mM
0
1
2
5
jours

c)

TABLEAU II-1 -

Action comparée de la L SAH et de la SIBA sur la croissance de FEP

a)

*Nombre de cellules au temps t / duits estés	t = 0	t = 48 h.	% d'inhibition	48 h. de réversion après 48 h. de contact
émoins	0,68	2,2		3,73
SAH 1 mM	0,68	0,53	76	1,16
IBA 0,5 mM	0,68	0,5	77	1,4

b)

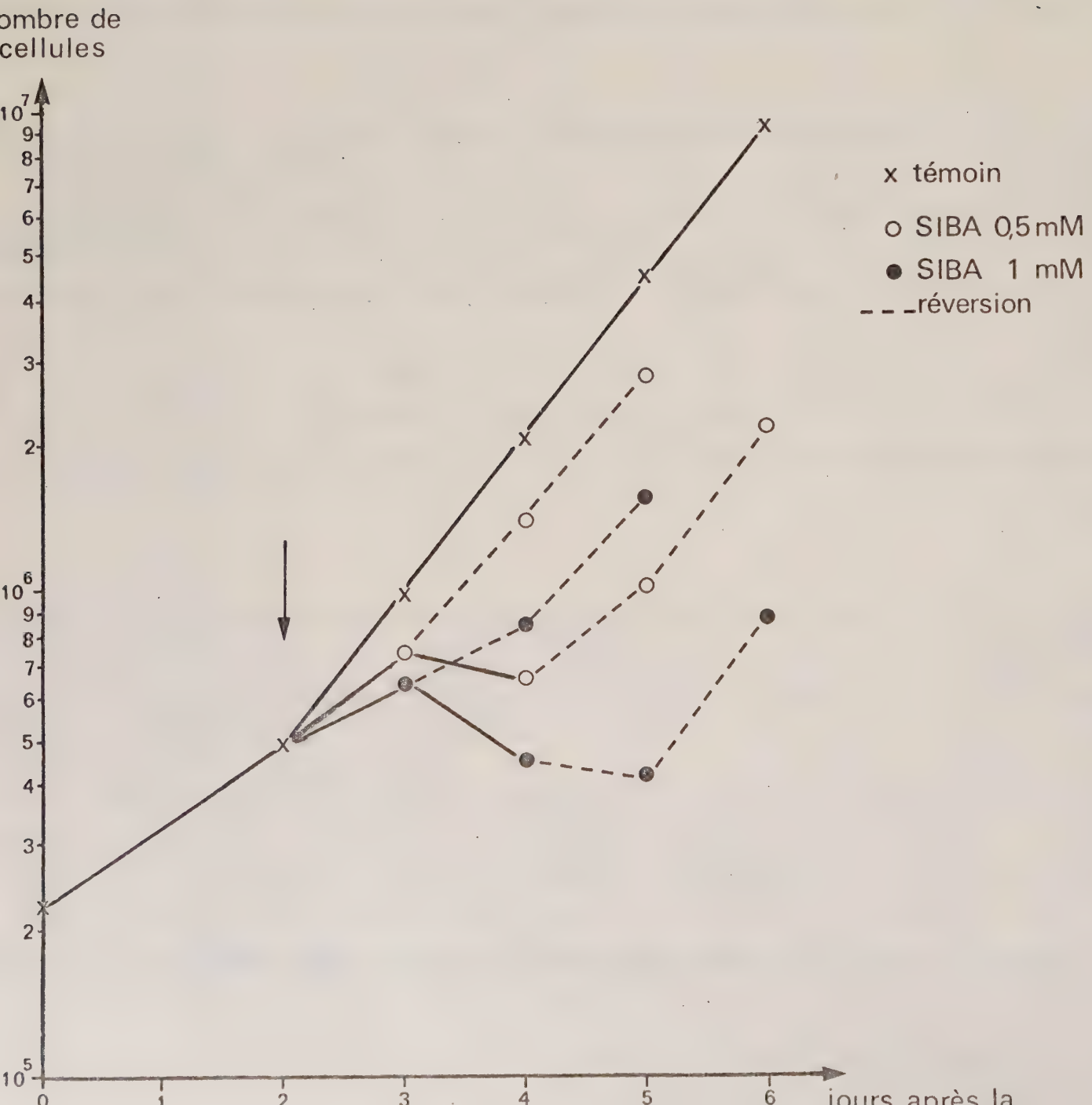
*Nombre de cellules au temps t / duits estés	t = 0	t = 48 h.	% d'inhibition	Après 48 h. de contact 72 heures de réversion	96 heures de réversion
émoins	0,5	1,5		3,7	6
IBA 1 mM	0,5	0,56	63	0,8	1,9
IBA 0,1 mM	0,5	0,9	40	2,6	3,5

c)

*Nombre de cellules au temps t / duits estés	t = 0	t = 24 h.	% d'inhibition	t = 48 h.	% d'inhibition	t = 5 jours	% d'inhibition	Après 5 jours de contact 24h de réversion	48h de réversion
moins	0,3	0,52		0,8		1,77		1,95	2,30
H 1 mM	0,3	0,48	6	0,55	31	0,95	46	1,5	2,45
BA 1 mM	0,3	0,35	33	0,4	50	0,8	55	1,25	1,75

* le nombre de cellules est x 10^6.

fig.II-2
Action de la SIBA sur une culture d'hépatome



Le Tableau II-1c) et la figure II-1c) nous montrent l'effet d'un contact prolongé de ces deux substances avec les FEP ; au bout de 5 jours, la SIBA freine la croissance des FEP avec le même pourcentage d'inhibition que la L SAH. Cet effet est réversible.

On peut donc constater que la L SAH et la SIBA ont la même action sur la croissance des FEP et que cette action est réversible, même après cinq jours de contact : Ces deux produits, dans ces conditions, ne sont pas toxiques pour les cellules normales.

Nous avons, en annexe à ce travail, testé la SIBA sur une culture d'hépatome de Reubera provenant de la souche Faza 967. Cet hépatome de rat ressemble beaucoup aux cellules de foie foetal normal.

Les résultats (figure II-2) révèlent que l'action de la SIBA 1 mM après 48 heures de contact, n'est pas immédiatement réversible : cette réversibilité ne se manifeste que 48 heures après le changement de milieu. Par contre, l'effet de la SIBA 0,5 mM est immédiatement réversible dans les mêmes conditions.

Pour 24 heures de contact, la réversibilité est immédiate. Il semble donc que le produit ne soit pas toxique non plus pour ces cellules.

II - ACTION COMPAREE DE LA L SAH ET DE LA SIBA SUR LA TRANSFORMATION

On a vu dans le Chapitre I que la SIBA 1 mM inhibe à 100 % la formation des foyers de cellules transformées après 48 heures de contact, tandis que la L SAH n'inhibe la transformation qu'à 20 %.

Nous avons voulu savoir si la SIBA agissait sur des cellules infectées mais non encore transformées (Tableau II-2). Pour cela, on a incubé des cellules avec la L SAH ou la SIBA à différents moments après l'infection ; pendant tout le temps de contact, les témoins ne présentaient pas le phénotype transformé.

TABLEAU II-2

Action de la SIBA et de la L SAH sur des FEP infectés par le VSR

Moment d'apport du produit à tester / produit testé	1 heure après infection		2 jours après infection		4 jours après infection	
	nombre de foyers	% d'inhibition	nombre de foyers	% d'inhibition	nombre de foyers	% d'inhibition
moin	72		110		72	
H 1 mM	58	19,5	112	0	60	17
BA 0,5 mM	23	68	60	45	2	97
BA 1 mM	0	100	6	95	0	100

LEGENDE : Après 48 heures de contact, avec les produits, le milieu est remplacé par du milieu normal et les foyers sont comptés 8 jours plus tard.

On constate que la SIBA, en contact pendant 48 heures avec les cellules infectées pendant la période où celles-ci ne sont pas encore transformées, empêche l'expression ultérieure du phénotype transformé, que ce contact ait lieu dès l'adsorption du virus ou même 2 à 4 jours après l'infection. On peut penser que l'effet de la SIBA est irréversible sur les cellules transformées car la lecture des foyers se fait 7 à 8 jours après la réversion.

.../...

La SIBA 0,5 mM semble moins active lorsqu'on l'ajoute 1 heure après l'infection.

Par contre, la L SAH n'a pratiquement pas d'effet sur la formation des foyers.

La L SAH et la SIBA semblent donc avoir la même action sur les cellules normales mais pas sur les cellules infectées. Une hypothèse a été émise au laboratoire, selon laquelle la L SAH serait dégradée plus rapidement par les cellules infectées que par les cellules normales. En fait, cette hypothèse ne semble pas valable car on a montré (71) que cette molécule est, au contraire, beaucoup plus vite dégradée par les cellules normales que par les cellules transformées et que la perte de ce pouvoir de dégradation est liée à la présence du virus transformant.

III - EFFET COMPARE DE LA L SAH ET DE LA SIBA SUR LA PRODUCTION VIRALE

A) Titrage de la production virale

L'obtention des cellules transformées a été décrite au Chapitre I. La L SAH et la SIBA 0,5 mM et 1 mM sont mises en contact avec des cellules transformées à environ 50 %.

Les cultures sans SIBA ou L SAH sont utilisées comme témoins. Chaque test est effectué en double.

Les surnageants de culture sont prélevés après 0 heure, 5 heures, 17, 24 et 48 heures de contact des substances avec les cellules. Après 24 heures, sur une série de boîtes, le surnageant contenant les effecteurs est remplacé par du milieu normal qui est prélevé un jour plus tard.

La quantité de virus produit est titrée dans tous ces surnageants après dilution adéquate par formation de foyers sur des cultures de FEP, selon la description faite au Chapitre I. On dénombre les foyers 7 jours après l'infection des FEP. Le nombre de foyers reflète la teneur en virus du surnageant.

L'inhibition est calculée par rapport aux cellules témoins non traitées.

B) Résultats

D'après le Tableau II-3 et la figure II-3, la SIBA 0,5 mM et 1 mM inhibe à 95-100 % la production virale dès 5 heures d'incubation. Cette action n'est pratiquement pas réversible après 24 heures de contact.

Il est surprenant de constater que la L SAH 1 mM inhibe seulement à 50 % la production virale et que son effet est immédiatement et totalement réversible.

.../...

TABLEAU II-3

Effet de la L SAH et de la SIBA sur la production virale

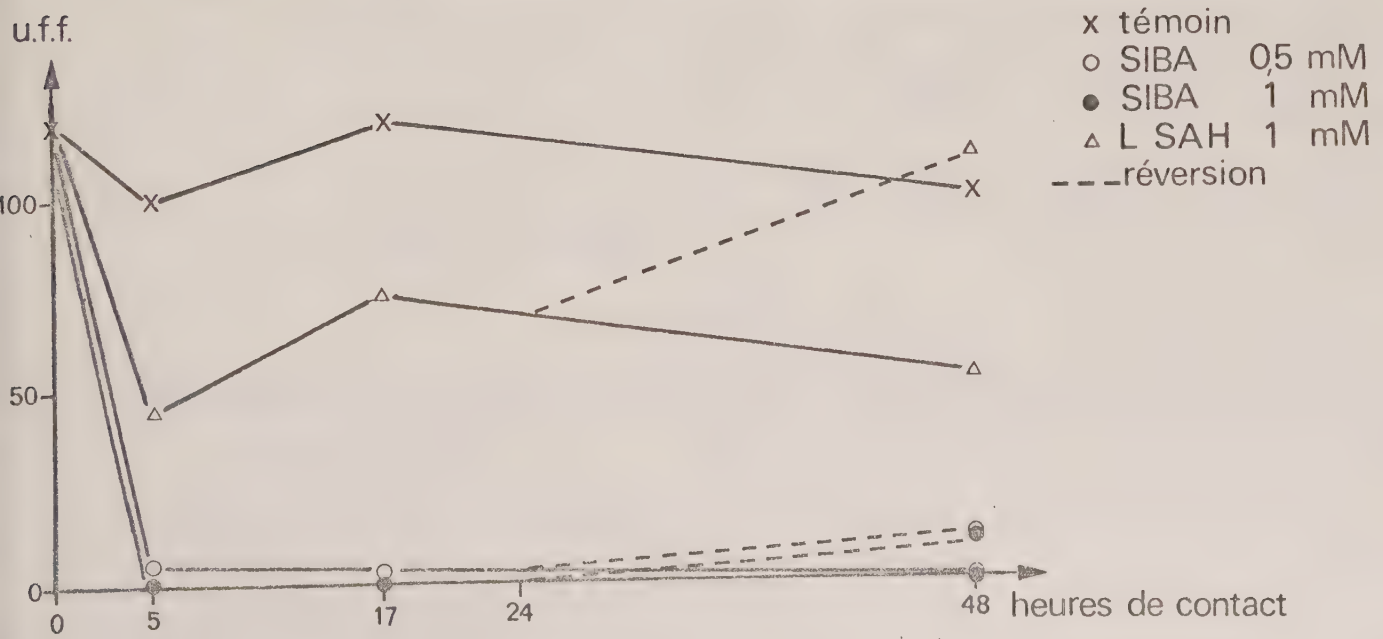
Produits testés / Temps de contact	Témoins	L SAH	SIBA 0,5 mM	SIBA 1 mM
t = 0	← 150 (10^{-5}) →			
t = 5 h.	100 (10^{-5})	45 (10^{-5})	5 (10^{-5})	15 (10^{-4})
t = 17 h.	120 (10^{-5})	75 (10^{-5})	33 (10^{-4})	11 (10^{-4})
t = 48 h.	100 (10^{-5})	53 (10^{-5})	15 (10^{-4})	1,5 (10^{-4})
T_{24} R_{24}	100 (10^{-5})	42 (10^{-5})	45 (10^{-4})	105 (10^{-4})

LEGENDE : . Les chiffres indiquent le nombre d'unités de formation de foyers (u.f.f.) ; les chiffres entre parenthèses indiquent la dilution du surnageant utilisée.

. Le sigle T_{24} R_{24} signifie que le contact du produit avec les cellules a eu lieu pendant 24 heures ; le milieu avec le produit a été remplacé par un milieu normal et le prélèvement a lieu 24 heures après le changement de milieu.

Figure II-3

Effet de la SIBA et de la L SAH sur la production virale



La L SAH et la SIBA présentent donc une analogie d'action sur les FEP mais ont une différence d'effet sur la transformation et la production virale. Afin d'élucider cette différence, nous avons entrepris l'étude du mécanisme d'action de la SIBA.

- CHAPITRE III -

Approche du mécanisme d'action de la SIBA

La SIBA inhibe l'expression du phénotype transformé et bloque complètement la production virale sans être pour cela toxique aux cellules normales. Comme la SIBA est un analogue structural de la SAH, nous avons tout d'abord étudié l'action de ce produit sur des méthylases, tant "in vitro" que sur des cultures de cellules.

I - ETUDE DE L'ACTIVITE ARN_t METHYLASIQUE DE FEP "IN VITRO"

Pour arriver aux conditions optimales du dosage, décrites au Chapitre I, un certain nombre de mises au point ont été nécessaires et sont décrites ci-dessous.

A) Choix d'un substrat hétérologue

Gold et al. (72) ont montré que dans la méthylation des acides nucléiques, il était nécessaire d'employer un substrat hétérologue à l'extrait enzymatique : le substrat homologue étant méthylé d'une façon optimale, il faut rechercher un substrat qui soit méthylable par l'extrait enzymatique et donc un substrat sous-méthylé.

Nous avons utilisé dans les essais préliminaires, de l'ARN (1 mg/ml) provenant d'E. Coli B, de foie de veau, ou de levure, en présence d'acétate d'ammonium ; la réaction de méthylation se fait à 30°C pendant une heure.

Le Tableau III-1 montre que c'est l'ARN d'E. Coli B qui est le meilleur substrat en tant qu'accepteur de groupements méthyles.

TABLEAU III-1

Méthylation de différents ARN par un extrait enzymatique de FEP

Source d'ARN	Activité spécifique (pmole/mg de protéine)
Coli B	115
levure	15
foie de veau	6

.../...

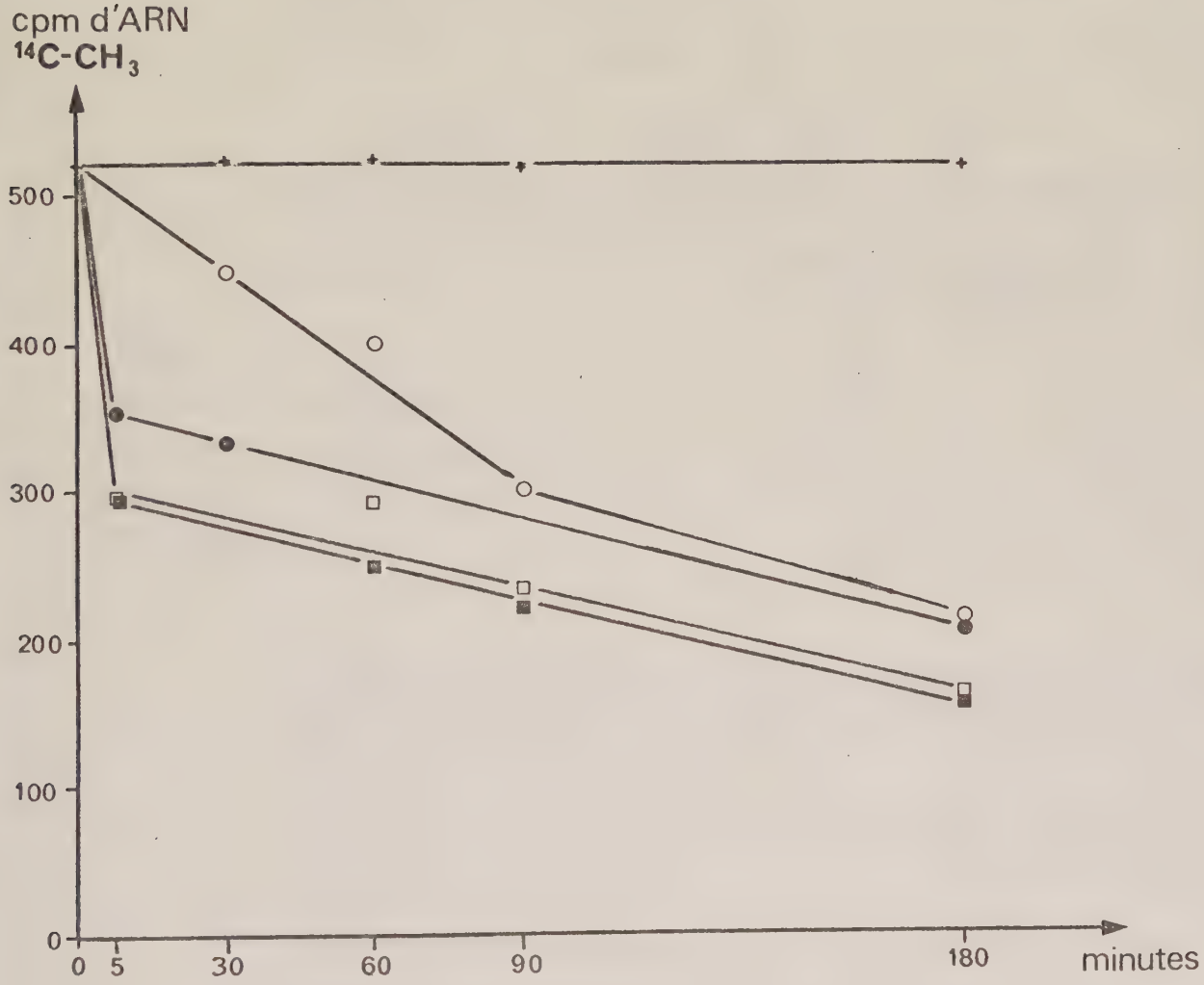
B) Température de la réaction de méthylation

La température physiologique de la méthylation est de 40°C.

C'est à cette température que devrait se dérouler "in vitro" la réaction. Cependant, nous avons constaté qu"in vitro" à 38°C, l'activité RNAsique n'est pas négligeable (figure III.1) et on risque de ne mesurer qu'un bilan de la méthylation de l'ARN et de sa dégradation.

FIGURE III-1

ction d'un extrait de FEP normaux ou transformés sur de l'ARN ^{14}C-CH_3 d'E. coli B



ENDE : De l'ARN d'E. Coli B a été préalablement méthylé avec de la SAM (^{14}C méthyle) par un extrait de FEP ; l'ARN est ensuite extrait par la méthode au phénol (73),(74).

L'ARN marqué est incubé à 38°C dans les conditions usuelles de méthylation, mais sans SAM,

1. avec des extraits dialysés de FEP normaux (O) ou de FEP transformés (●)
2. avec le surnageant d'extraits centrifugés 1 h. 30 à 105.000 g obtenus à partir de FEP normaux (□) ou de FEP transformés (■)
3. Seul (+)

.../...

C'est pourquoi on a choisi 30°C comme température du milieu réactionnel. Naturellement, l'activité spécifique est moins importante à 30°C (116 pmole/mg) qu'à 38°C (195 pmole/mg).

C) Action de stimulateurs de l'activité ARN_t méthylasique

Nous avons vu (20), (16), l'ion ammonium et des polyamines (21) peuvent stimuler l'activité ARN_t méthylasique "in vitro". C'est pourquoi nous avons essayé ces effecteurs sur notre système enzymatique : l'ion NH_4^+ et la spermine (Hoffmann-La Roche).

TABLEAU III-2

Action de la spermine et de l'ion NH_4^+ sur l'activité ARN_t méthylasique de FEP "in vitro"

Effecteur	Activité spécifique (1 heure à 30°C)
Aucun	55
Acétate d'ammonium 0,1 M	87
Acétate d'ammonium 0,25 M	116
Spermine $2\ 10^{-3}$ M	72
Spermine $5\ 10^{-3}$ M	70

Le Tableau III-2 montre que la spermine et l'acétate d'ammonium stimulent l'activité ARN_t méthylasique ; ceci est en accord avec les résultats de Leboy et al. (16),(21) et de Rudeh et al. (20).

Cependant, l'ion ammonium 0,25 M stimule le plus la réaction enzymatique. Nous avons donc utilisé ce dernier dans les réactions enzymatiques.

D) Stabilité de l'activité ARN_t méthylasique de FEP

L'activité enzymatique décroit avec le temps : au bout de 12 jours, elle n'est plus que de 106 pmole/mg contre 195 pmole le 1er jour (dosage effectué à 38°C) ; elle a donc baissé de près de 50 %.

D'autre part, la congélation de l'extrait puis sa décongélation inactivent définitivement l'activité ARN_t méthylasique.

E) Comparaison de l'activité ARN_t méthylasique de FEP normaux ou transformés par le VSR

L'activité spécifique des cellules normales est de 116 pmoles /mg ; celle des cellules transformées est de 174 pmoles/mg. On n'observe donc pas une différence très marquée pour cette activité enzymatique entre les FEP normaux ou transformés ; on constate que l'activité est un peu plus élevée pour les cellules transformées.

F) Action de la SIBA et de la L SAH sur l'activité ARN_t méthylasique de FEP normaux ou transformés par le VSR

Le Tableau III-3 résume l'effet de la SIBA et de la L SAH sur l'activité ARN_t méthylasique des FEP normaux ou transformés.

TABLEAU III-3

Affinités de l'activité ARN_t méthylasique de FEP normaux ou ou transformés pour la SAM, la SIBA et la L SAH

	FEP normaux	FEP transformés
SAM	$182\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$	$179\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$
L SAH	$666\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$	$286\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$
SIBA	$0{,}280\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$	$0{,}333\ 10^{-9}$ pmole $^{-1}$

LEGENDE : L'affinité est l'inverse de la constante K_M pour la SAM et du Ki pour les effecteurs.

L'affinité pour la SAM est la même pour les cellules normales ou transformées.

D'autre part, la L SAH montre plus d'affinité pour le site actif que la SIBA. Cette affinité pour la L SAH est plus importante dans les cellules normales que dans les cellules transformées ; l'affinité pour la SIBA est un peu plus élevée dans les cellules transformées. Cependant la différence avec les cellules normales n'est pas aussi importante que la L SAH.

II - EFFET DE LA L SAH ET DE LA SIBA SUR LA PENETRATION ET SUR L'INCORPORATION DE LA METHIONINE (3H-METHYLE) PAR DES FEP NORMAUX OU TRANSFORMES EN CULTURE

A) Marquage des cultures de FEP

Des cultures secondaires de FEP sont ensemencées dans des boîtes Falcon de 6,5 cm de diamètre à raison de 500.000 cellules par boîte dans 3 ml de milieu F_{10} de Ham (75) contenant du sérum de veau à 5 %, de la glutamine 1 mM et des antibiotiques.

.../...

Cellules normales :

Un jour après la mise en culture, on change le milieu par un milieu contenant du sérum de veau à 2 %, du formiate de sodium 20 mM, de l'adénosine 20 µM et de la guanosine 20 µM afin d'inhiber l'incorporation de la méthionine dans les purines et les pyrimidines par la voie du formiate. (76)

Cellules transformées :

On utilise le même protocole que pour les cellules normales lorsque les cellules sont transformées à 50-60 %.

Dans tous les cas, 24 heures après le changement de milieu, on introduit de la L méthionine (3H-méthyle) (CEA, Activité spécifique 11 Ci/mM) à raison de 7 µCi/boîte et la SIBA 0,5 mM, 1 mM ou la L SAH 1 mM.

On arrête le marquage aux temps 0, 5-6, 17, 24 et 48 heures en plaçant les boîtes dans de la glace et en les rinçant avec du PBS glacé contenant 0,5 % de L méthionine. Les boîtes sont stockées à -20°C en attendant d'être étudiées.

La répartition de la radioactivité est mesurée par la méthode à l'acide trichloracétique (décrite dans la première partie).

B) Pénétration de la Méthionine 3H-Méthyle

On définit l'inhibition de la pénétration de la méthionine en mesurant toute la radioactivité ayant pénétré dans les cellules traitées par rapport à celle des cellules témoins.

TABLEAU III-4

Evolution au cours du temps du transport global de la méthionine 3H-méthyle dans des FEP normaux ou transformés

a) Cellules normales

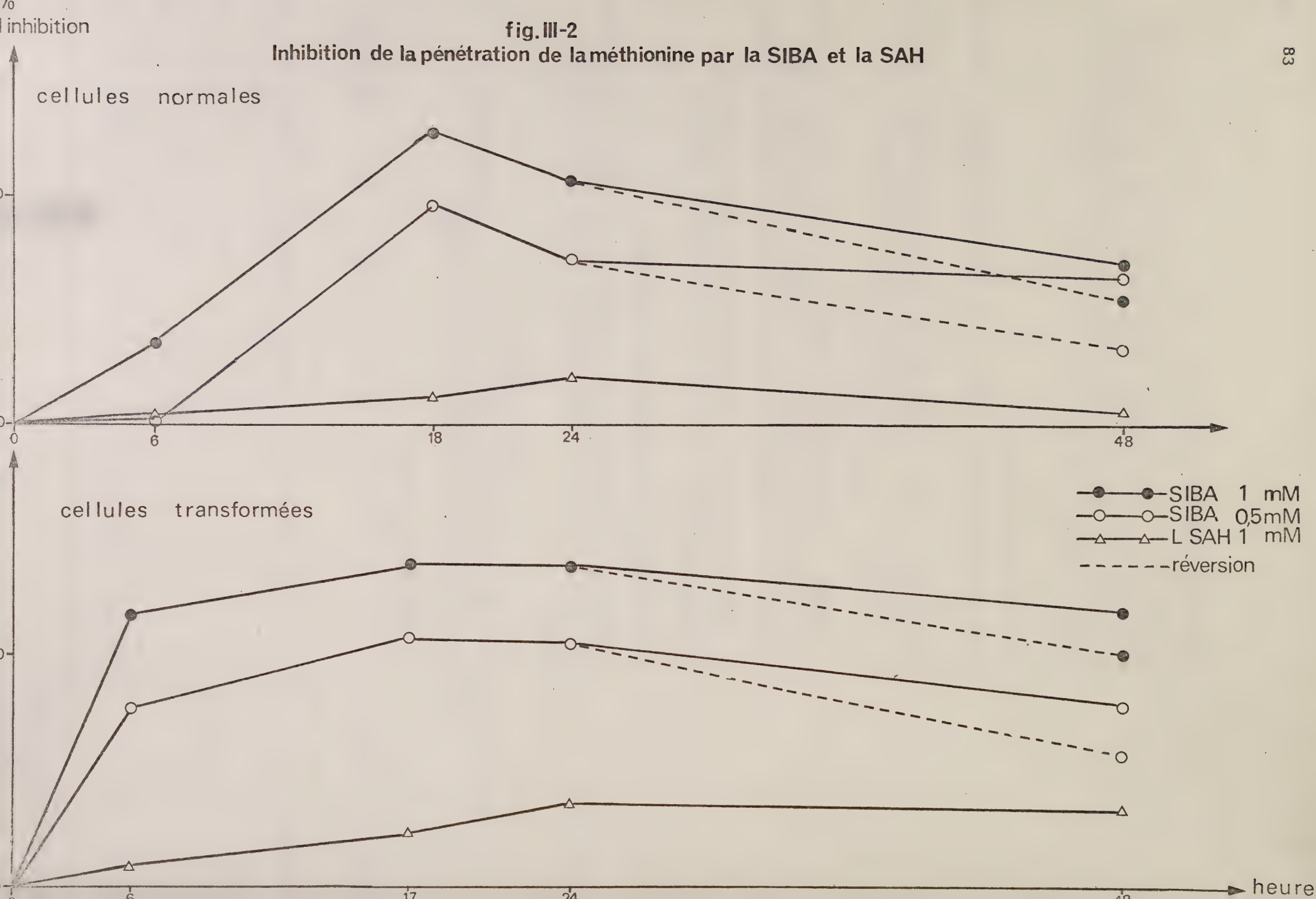
Temps de marquage	0 h.	5-6 h.	18 h.	24 h.	48 h.	Réversion (T_{24} R_{24})
Témoins XX	400 400	921 000	3 459 000	3 478 000	3 748 000	4 513 000
SAH 1 mM XX	236 000	900 000	3 243 000	3 116 000	3 631 000	3 741 000
SIBA 0,5 mM XX	291 000	911 000	1 866 000	2 210 000	2 521 000	3 753 000
SIBA 1 mM XX	302 000	756 500	1 621 000	1 617 000	2 418 000	3 090 000

(dpm/10^6 cellules)

.../...

fig. III-2

Inhibition de la pénétration de la méthionine par la SIBA et la SAH



b) Cellules transformées

Temps de marquage		0	5 h.	17 h.	24 h.	48 h.	Réversion
Témoins	¤	107 600	778 500	3 349 000	3 807 000	3 882 000	4 649 000
SAH 1 mM	¤	79 850	749 000	2 975 000	3 137 000	3 235 000	4 220 000
SIBA 0,5 mM	¤	81 300	478 000	1 551 000	1 807 000	2 373 000	3 300 000
SIBA 1 mM	¤	69 150	321 000	1 016 000	1 130 000	1 571 000	2 265 000

¤ (dpm/10^6 cellules)

Le Tableau III-4 et la figure III-2 montrent que la cinétique de pénétration est différente entre les cellules normales et les cellules transformées. Dès la 5ème heure, la SIBA 1 mM inhibe à plus de 50 % la pénétration de la méthionine dans les cellules transformées alors que cette inhibition est faible dans les cellules normales.

L'inhibition est maximale à 18 heures dans les deux cas (65 - 70 %). Cependant, elle décroit dans les cellules normales tandis qu'elle semble plus stable dans les cellules transformées.

Le transport de la méthionine semble donc être inhibé par la SIBA plus tôt et plus durablement dans les cellules transformées que dans les cellules normales.

Le parallèlisme des courbes "SIBA 0,5 mM" et "SIBA 1 mM" peut être interprêté comme une relation entre l'effet et la dose.

Dans tous les cas, on observe une tendance à la réversibilité après 24 heures de contact et 24 heures de réversion.

La L SAH quant à elle n'inhibe pratiquement pas la pénétration de la méthionine ; cette inhibition ne dépasse pas 10 % dans les cellules normales et 20 % dans les cellules transformées.

Il est donc d'ores et déjà certain que la SIBA interfère avec le transport de la méthionine 3H-méthyle dans les cellules.

Ce transport global reflète le bilan de la perméabilité vis-à-vis de la méthionine et l'incorporation de celle-ci dans la cellule.

Nous avons mesuré pour 5 heures de contact avec la SIBA et la méthionine (3H-méthyle) la répartition de la radioactivité dans les différentes fractions cellulaires afin dévaluer l'inhibition de la perméabilité et de l'incorporation de la méthionine 3H-méthyle.

.../...

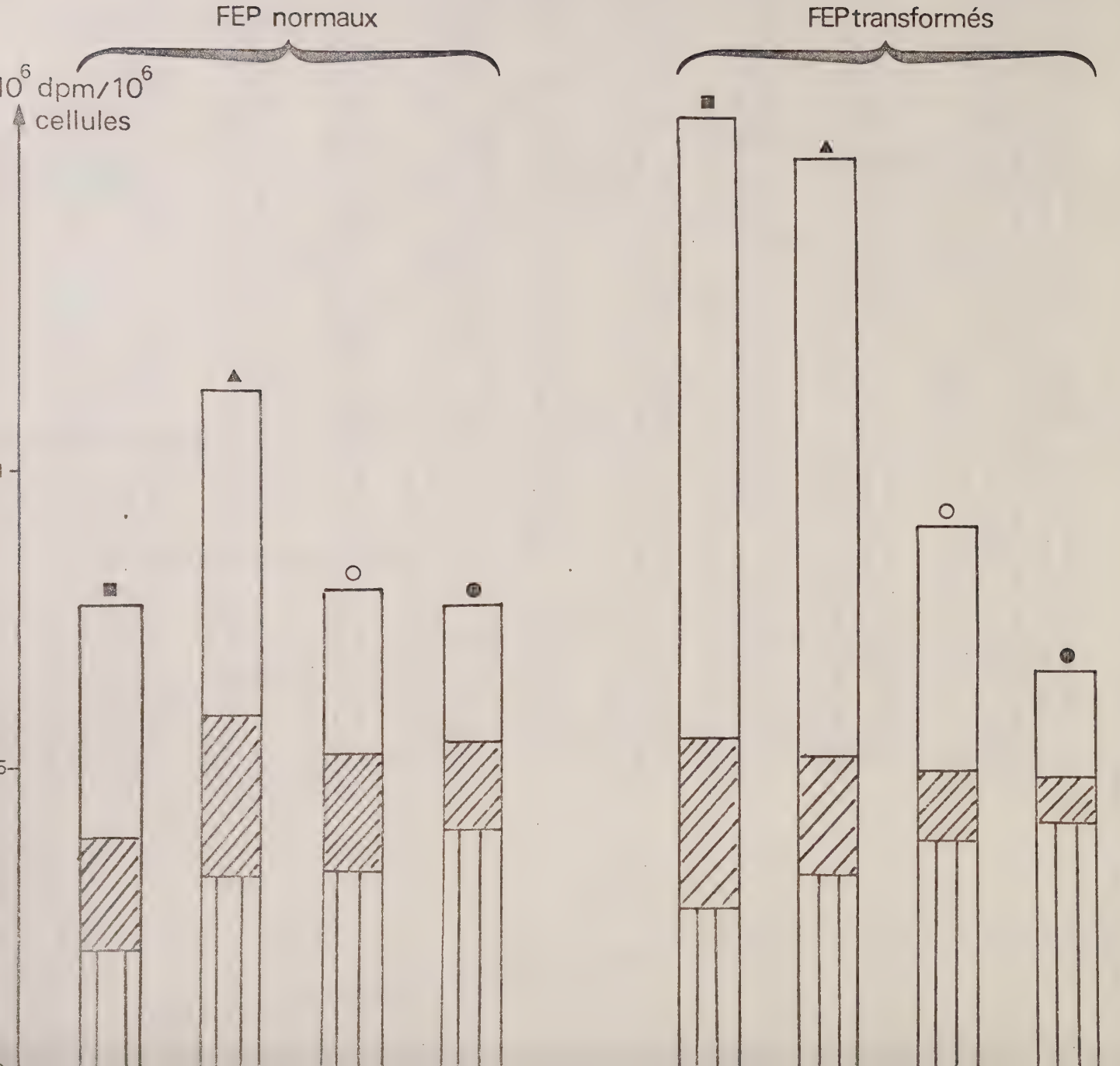


fig.III-3. Action de la SIBA et de la L SAH sur l'incorporation de la méthionine $^3H-CH_3$ par des cultures de FEP normaux ou transformés.

C) Incorporation de la méthionine 3H-méthyle

Après 5 heures de marquage, on a étudié la répartition de la radioactivité dans les protéines, les acides nucléiques et dans la fraction acido-soluble .

TABLEAU III-5

Répartition de la radioactivité dans des fractions cellulaires de FEP normaux ou transformés incorporant de la méthionine 3H-méthyle

a) Cellules normales

	Fraction acido-soluble		Acides nucléiques totaux		Protéines		Pénétration totale
	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules
moins	201 000	26	190 000	24	389 000	50	780 000
H 1 mM d'inhibition	321 000 + 7 %	28	276 000 0 %	24	542 000 4 %	48	1 139 000 + 46 %
BA 0,5 mM d'inhibition	331 000 + 58 %	41	204 000 0 %	25	270 000 32 %	34	805 000 + 3 %
BA 1 mM d'inhibition	400 000 + 100 %	52	150 000 20 %	19	230 000 42 %	29	780 000 0 %

b) Cellules transformées

	Fraction acido-soluble		Acides nucléiques totaux		Protéines		Pénétration totale
	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules	% de répartition	dpm/10^6 cellules
moins	272 000	17	287 000	18	1 044 000	65	1 603 000
H 1 mM d'inhibition	325 000 + 23 %	21	199 000 26 %	13	1 006 000 0 %	66	1 530 000 4 %
BA 0,5 mM d'inhibition	380 000 + 118 %	37	121 000 26 %	13	409 000 23 %	50	910 000 43 %
BA 1 mM d'inhibition	412 000 + 265 %	62	77 000 30 %	11	180 000 58 %	27	669 000 58 %

GENDE : Le pourcentage d'inhibition pour la pénétration totale est calculé d'après la relation : $\frac{\text{Témoin - Essai}}{\text{Témoin}} \times 100$.

.../...

Le pourcentage de répartition est établi d'après la relation :

$$\frac{\text{Incorporation dans la fraction considérée}}{\text{Pénétration totale}} \times 100$$

L'inhibition d'incorporation est établie en comparant la répartition des cellules traitées à celle des cellules témoins, en utilisant la relation :

$$\frac{\text{\% de répartition du Témoin - \% de répartition de l'essai}}{\text{\% de répartition du témoin}} \times 100$$

Le Tableau III-5 et la figure III-3 montrent que la SIBA inhibe surtout l'incorporation de la radioactivité dans les protéines des cellules normales et des cellules transformées. On ne peut cependant pas affirmer que ce sont les méthylations seules qui sont touchées car l'incorporation de la méthionine comme acide aminé dans la synthèse protéique peut aussi être affectée.

Chez les cellules normales, la méthylation des acides nucléiques est faiblement inhibée par la SIBA 1 mM et pas du tout par la SIBA 0,5 mM.

Chez les cellules transformées, on observe une inhibition d'incorporation de la radioactivité dans les acides nucléiques par la SIBA ; cette inhibition dépend de la concentration en inhibiteur.

La L SAH n'inhibe pas l'incorporation de la méthionine dans les cellules normales ; par contre, dans les cellules transformées, elle semble inhiber un peu la méthylation des acides nucléiques.

III - EFFET DE LA SIBA ET DE LA L SAH SUR DES SYNTHESES MACROMOLECULAIRES DE FEP NORMAUX OU TRANSFORMEES

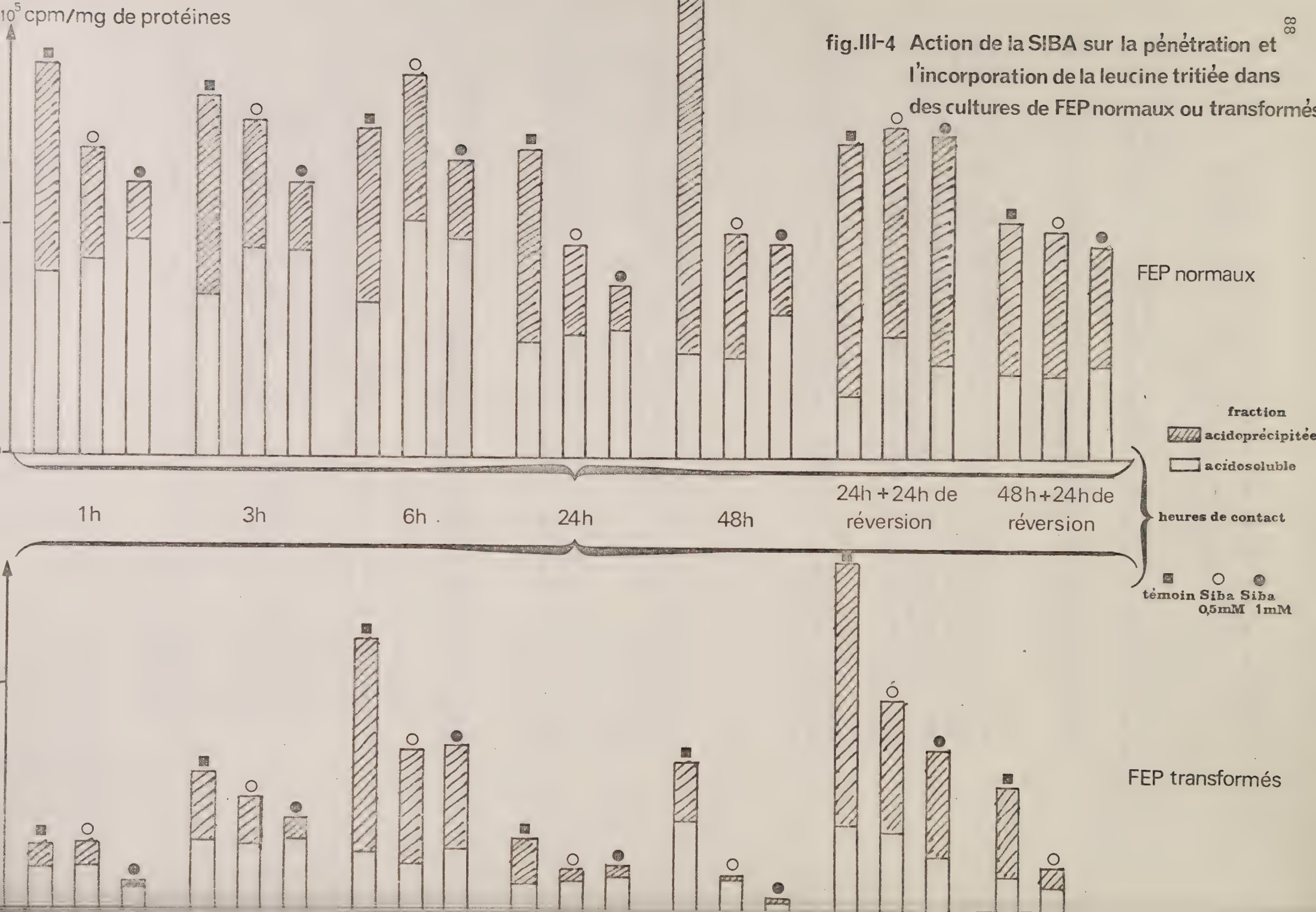
A) Marquage des cellules

Après différents temps de contact avec la SIBA, de la L leucine tritiée (35 Ci/mM), 5 µCi/ml, de l'uridine tritiée (1 Ci/mM), 2 µCi/ml ou de la thymidine tritiée (52 Ci/mM), 2 µCi/ml sont ajoutés au milieu des cellules normales ou transformées. Le marquage radioactif des cellules est fait pendant une heure à 37°C. On arrête le marquage en plaçant des boîtes dans la glace et en les rinçant avec du PBS glacé contenant 0,5 % des précurseurs non radioactifs.

La répartition de la radioactivité dans les macromolécules est étudiée selon la méthode décrite dans la première partie au Chapitre I.

.../...

fig.III-4 Action de la SIBA sur la pénétration et l'incorporation de la leucine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés



B) Effet de la SIBA sur la pénétration et sur l'incorporation de la leucine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés

Le Tableau III-6 et la figure III-4 montrent que la pénétration globale de l'acide aminé est fortement inhibée par la SIBA dans les cellules normales ou transformées. Dans tous les cas, cette inhibition augmente avec le temps.

L'inhibition de la pénétration est réversible pour les cellules normales mais pas pour les cellules transformées.

D'autre part, la teneur en leucine marquée augmente en présence de la SIBA dans la fraction acidosoluble, tant chez les cellules normales que chez les cellules transformées. Or, l'incorporation de cet acide aminé est inhibée dans la fraction acido-précipitable des deux types de cellules. Ces deux phénomènes traduisent une inhibition par la SIBA de l'incorporation de la leucine dans les protéines des cellules normales ou transformées.

Cette inhibition tend à petre réversible pour les FEP normaux alors qu'elle l'est beaucoup moins pour les FEP transformés dans les mêmes conditions.

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus sur la pénétration globale de la méthionine 3H-méthyle, nous voyons que l'inhibition évolue de la même manière au cours du temps pour ces deux acides aminés : elle augmente jusqu'à 48 heures de contact.

La SIBA inhibe la synthèse protéique et la méthylation des protéines et des acides nucléiques ; on a donc voulu voir si cette inhibition a une répercussion sur la synthèse des acides nucléiques.

TABLEAU III-6

Effet de la SIBA et de L SAH sur la pénétration et l'incorporation de la L leucine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés

a) Pénétration globale

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XX
Témoin	853.000	783.000	718.000	670.000	1083.000	688.000	517.000
SIBA 0,5 mM	671.000	734.000	835.000	464.000	492.000	725.000	499.000
SIBA 1 mM	594.000	595.000	647.000	377.000	470.000	704.000	463.000

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XX
Témoin	148.000	310.000	599.000	167.000	335.000	773.000	285.000
SIBA 0,5 mM	154.000	254.000	359.000	97.000	87.000	476.000	111.000
SIBA 1 mM	72.000	210.000	373.000	109.000	38.000	364.000	-

LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines

X 24 heures de contact + 24 heures de réversion

XX 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

b) Incorporation dans les fractions acido précipitables

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XX
Témoin % de répartition	449.000 53 %	432.000 55 %	380.000 53 %	422.000 63 %	782.000 72 %	552.000 80 %	331.000 64 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	242.000 36 %	280.000 38 %	319.000 38 %	200.000 43 %	270.000 37 %	459.000 93 %	318.000 63 %
SIBA 1 mM % de répartition	126.000 21 %	145.000 24 %	173.000 27 %	98.000 26 %	158.000 22 %	501.000 71 %	258.000 56 %

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XX
Témoin % de répartition	47.000 32 %	150.000 52 %	464.000 77 %	95.000 57 %	127.000 38 %	573.000 74 %	198.000 69 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	49.000 32 %	107.000 42 %	197.000 55 %	22.000 23 %	13.000 15 %	287.000 60 %	43.000 39 %
SIBA 1 mM % de répartition	12.000 17 %	46.000 22 %	117.000 31 %	23.000 21 %	7.000 18 %	227.000 62 %	Cellules mortes

LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines.

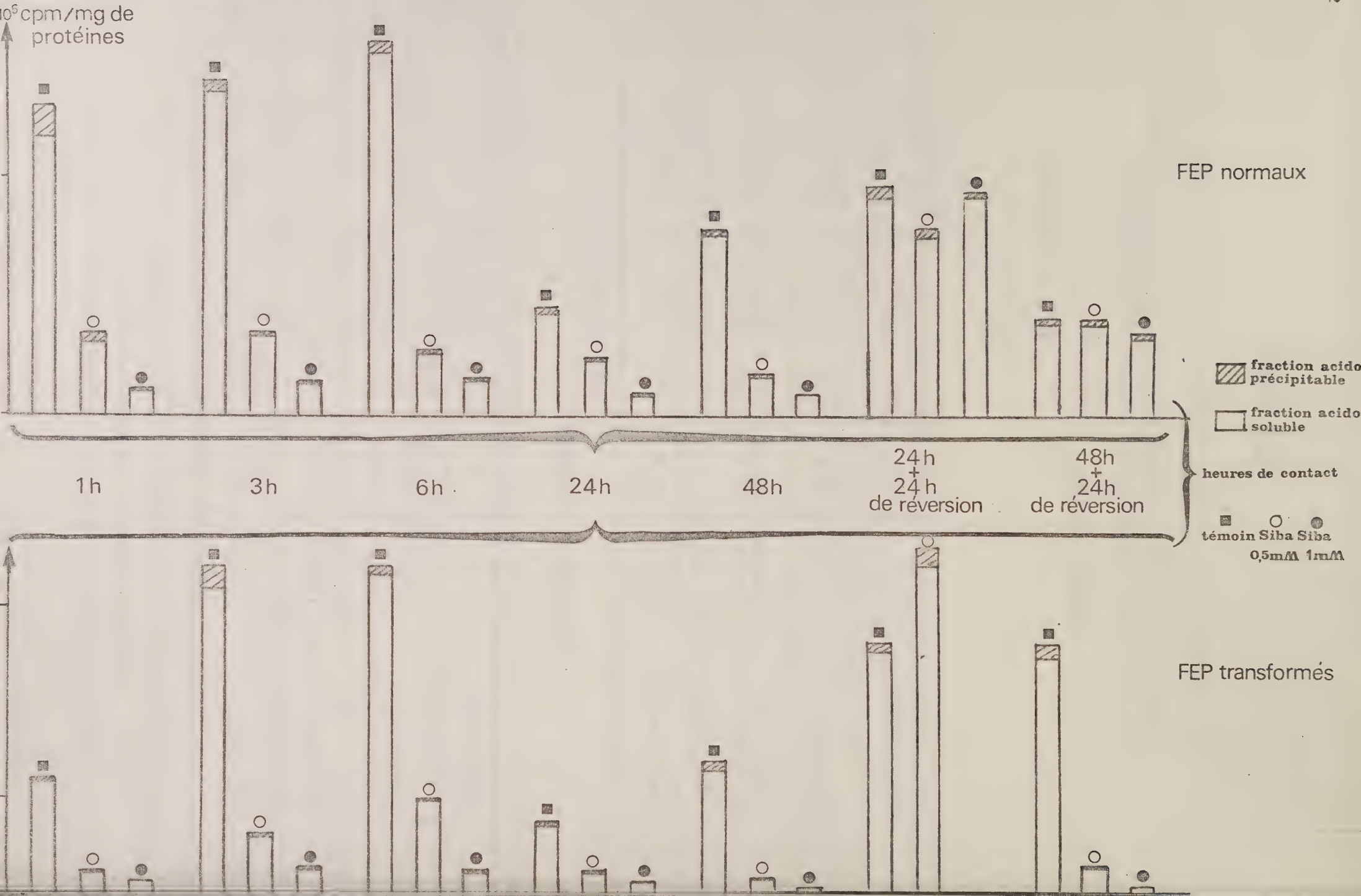
X 24 heures de contact + 24 heures de réversion

XX 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

fig. III-5

Action de la SIBA sur la pénétration de l'uridine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés



C) Effet de la SIBA sur la synthèse des acides nucléiques

1. Action sur la pénétration de l'uridine tritiée dans l'ARN

Le Tableau III-7 et la figure III-5 montrent que dès une heure de contact avec la SIBA, la radioactivité dans les fractions acidosolubles et acidoprécipitables baisse très fortement pour les cellules normales ou transformées. Cette inhibition est proportionnelle au temps de contact et à la concentration en SIBA.

L'action de la SIBA est réversible pour les cellules normales, après 48 heures de contact. Par contre, elle n'est plus réversible pour les cellules transformées dans les mêmes conditions.

Comme la SIBA 1 mM inhibe à environ 90 % la pénétration et le transport de l'uridine dans les deux types de cellules, son effet sur la synthèse de l'ARN, ne peut être étudié par cette méthode.

CHAPITRE III-7

Effet de la SIBA et de L SAH sur la pénétration et l'incorporation de l'uridine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés

a) Pénétration globale

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XXX
Témoin	6502.000	7053.000	7870.000	2250.000	3937.000	4984.000	2044.000
SIBA 0,5 mM % d'inhibition	1766.000 73 %	1740.000 75 %	1357.000 83 %	1207.000 46 %	881.000 78 %	3919.000 21 %	2015.000 0 %
SIBA 1 mM % d'inhibition	580.000 91 %	704.000 90 %	788.000 90 %	456.000 80 %	453.000 88 %	4671.000 6,2 %	1738.000 15 %

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	X	XXX
Témoin	1200.000	3400.000	3400.000	712.000	1362.000	2597.000	2586.000
SIBA 0,5 mM % d'inhibition	230.000 81 %	694.000 80 %	971.000 71 %	212.000 70 %	135.000 90 %	3623.000 + 40 %	267.000 90 %
SIBA 1 mM % d'inhibition	101.000 92 %	252.000 93 %	215.000 94 %	70.000 90 %	24.000 98 %	- -	49.000 98 %

LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines.

X 24 heures de contact + 24 heures de réversion

XXX 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

b) Incorporation dans les fractions acido précipitables

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	Ⅹ	ⅩⅩ
Témoin % de répartition	677.000 10 %	234.000 3,3 %	224.000 2,8 %	98.000 4,8 %	113.000 2,9 %	215.000 4,3 %	91.000 4,5 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	195.000 11 %	65.000 3,7 %	67.000 4,9 %	34.000 2,8 %	49.000 5,6 %	153.000 3,9 %	86.000 4,3 %
SIBA 1 mM % de répartition	40.000 7 %	20.000 2,8 %	20.000 2,5 %	11.000 2,4 %	17.000 3,8 %	108.000 2,3 %	87.000 5 %

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	Ⅹ	ⅩⅩ
Témoin % de répartition	61.000 5 %	231.000 6,8 %	95.000 2,8 %	41.000 5,8 %	108.000 7,9 %	107.000 4,1 %	140.000 5,4 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	12.000 5,2 %	38.000 5,5 %	10.000 1 %	9.000 4,2 %	6.000 4,4 %	217.000 6 %	15.000 5,6 %
SIBA 1 mM % de répartition	5.000 4,9 %	14.000 5,5 %	11.000 5,1 %	2.000 2,8 %	100 0,4 %	73.000 -	2.000 4 %

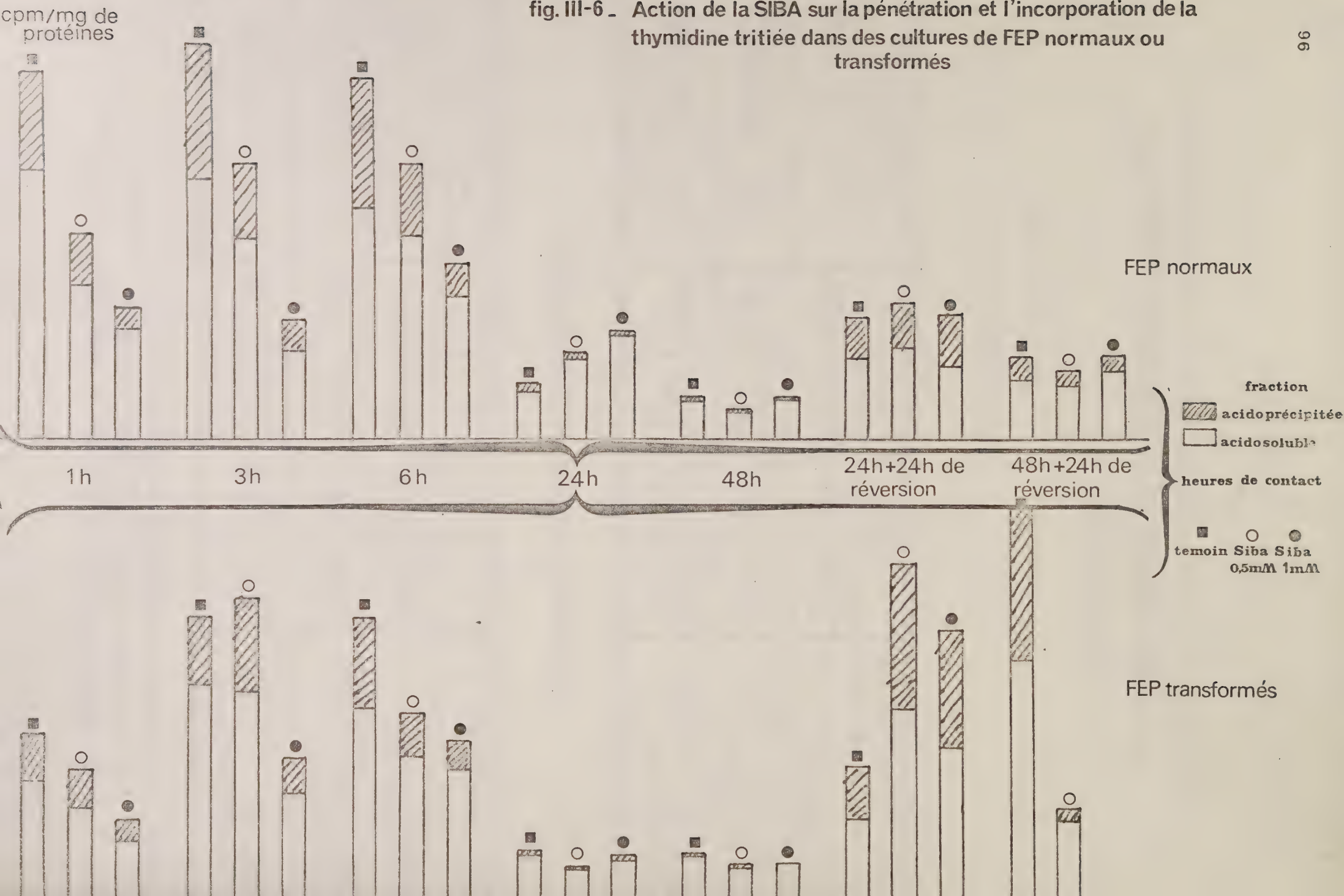
LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines.

Ⅹ 24 heures de contact + 24 heures de réversion

ⅩⅩ 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

fig. III-6 _ Action de la SIBA sur la pénétration et l'incorporation de la thymidine tritiée dans des cultures de FEP normaux ou transformés



2. Action sur la pénétration et l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN

D'après les Tableau III-8 et la figure III-6, la pénétration globale de la thymidine est assez freinée (environ 50 %), tant dans les cellules normales que dans les cellules transformées et ceci jusqu'à 6 heures de contact avec la SIBA 1 mM.

L'effet inhibiteur sur la pénétration diminue au delà de 24 heures de présence de la SIBA dans le milieu et devient nul au bout de 48 heures.

Jusqu'à 6 heures de contact, l'incorporation dans la fraction acidosoluble diminue par rapport au témoin ce qui semble indiquer que c'est surtout le transport de la thymidine qui est touché.

Par contre, on constate qu'après 24 heures, la synthèse d'ADN diminue dans les témoins des deux types de cellules et que la SIBA inhibe fortement cette synthèse.

Après 48 heures, cet effet semble réversible pour les cellules normales et irréversibles pour les cellules transformées.

.../...

TABLEAU III-8

Effet de la SIBA et de L SAH sur la pénétration et l'incorporation de la 3H-Thymidine par des cultures de FEP normaux ou transformés

a) Pénétration globale

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	XX	XXX
Témoin	315.000	337.000	308.000	48.000	35.000	103.000	70.000
SIBA 0,5 mM % d'inhibition	177.000 43 %	235.000 30 %	235.000 24 %	73.000 + 52 %	23.000 34 %	116.000 0 %	57.000 19 %
SIBA 1 mM % d'inhibition	112.000 64 %	102.000 70 %	150.000 51 %	92.000 + 12 %	37.000 + 5 %	105.000 0 %	71.000 0 %

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	XX	XXX
Témoin	75.000	124.000	123.000	24.000	23.000	60.000	171.000
SIBA 0,5 mM % d'inhibition	59.000 21 %	132.000 + 6 %	83.000 32 %	17.000 29 %	18.000 22 %	147.000 + 145 %	42.000 75 %
SIBA 1 mM % d'inhibition	38.000 49 %	64.000 48 %	71.000 42 %	22.000 8 %	19.000 17 %	118.000 + 96 %	- -

LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines.

XX 24 heures de contact + 24 heures de réversion

XXX 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

b) Incorporation dans la fraction acido précipitable

1. Cellules normales

Temps (heure)	1	3	6	24	48	Ⅹ	ⅩⅩ
Témoin % de répartition	82.000 26 %	114.000 34 %	111.000 36 %	8.000 17 %	4.000 11 %	35.000 34 %	20.000 29 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	43.000 24 %	63.000 27 %	61.000 26 %	5.000 7 %	728 3 %	35.000 30 %	13.000 23 %
SIBA 1 mM % de répartition	17.000 15 %	25.000 25 %	27.000 18 %	4.000 4 %	572 2 %	43.000 41 %	14.000 20 %

2. Cellules transformées

Temps (heure)	1	3	6	24	48	Ⅹ	ⅩⅩ
Témoin % de répartition	20.000 27 %	29.000 23 %	38.000 31 %	2.000 8 %	1.000 4 %	22.000 37 %	66.000 39 %
SIBA 0,5 mM % de répartition	16.000 27 %	35.000 27 %	19.000 23 %	1.000 6 %	1.000 6 %	62.000 42 %	5.000 12 %
SIBA 1 mM % de répartition	9.000 24 %	15.000 23 %	12.000 17 %	2.000 9 %	0 0 %	50.000 42 %	- -

LEGENDE : Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines.

Ⅹ 24 heures de contact + 24 heures de réversion

ⅩⅩ 48 heures de contact + 24 heures de réversion

.../...

IV - CONCLUSION

La SIBA comparée à la L SAH est un mauvais inhibiteur de l'activité ARN_t méthylasique "in vitro". Or la SIBA inhibe la méthylation et la synthèse des protéines et de l'ADN ainsi que le transport de l'uridine dans les cellules normales ou transformées.

Tous ces effets sont réversibles sur des cellules normales alors qu'ils semblent irréversibles sur des cellules transformées.

- CHAPITRE IV -

Discussion et conclusion générale

Nous avons vu que la SIBA empêche irréversiblement — une semaine au moins après la réversion — la transformation des cellules infectées et la production virale par des cellules transformées. Par contre, son action est totalement réversible sur la croissance des cellules normales.

On aurait pu penser, d'après l'hypothèse de Borek, que l'inhibition de l'activité ARN_t méthylasique pouvait expliquer cet effet sur la transformation.

Nos résultats ne permettent pas d'exclure une action sur les méthylations comme le suggèrent les marquages à la méthionine 3H-méthyle. Une étude approfondie de la méthylation des bases mineures dans les acides nucléiques ou des sites de méthylation dans les protéines, qui suivra le travail tranchera, nous l'espérons, la question.

Il est donc difficile à l'heure actuelle de conclure sur l'effet primaire de cet inhibiteur, d'autant plus qu'il touche l'ensemble des synthèses macromoléculaires. Or un blocage de la synthèse protéique pourrait, par exemple, entraîner une inhibition de la perméabilité, de la synthèse d'ADN et d'ARN, en conséquence de quoi les méthylations ne pourraient avoir lieu.

Cependant, le fait que les cellules transformées ou infectées soient les plus sensibles à l'action de la SIBA et que la production virale soit touchée, nous ont suggéré que la SIBA peut interférer avec une étape du cycle viral, d'où l'inhibition de l'expression du phénotype transformé.

Nous avons alors pensé que la formation de l'ADN viral pouvait nécessiter des méthylations et que l'inhibition de ces méthylations empêcherait l'intégration du génome viral ou perturberait son expression.

Actuellement, nous travaillons sur la mise en évidence d'une telle activité méthylasique dans le virus du Sarcome de Rous.

- PUBLICATIONS -

1. ROBERT-GERO M., LAWRENCE F., FARRUGIA G., BERNEMAN A., BLANCHARD P., VIGIER P. and LEDERER E., *Inhibition of virus induced cell transformation by synthetic analogues of S adenosyl L homocystéine*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 65, n° 4, 1242-1249

2. Communication au 10ème Congrès international de Biochimie (Hambourg 1976)

- BIBLIOGRAPHIE -

(1) SRINIVASAN P.R. and BOREK E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1963, 49, 529-533

(2) SRINIVASAN P.R. and BOREK E., *Science*, 1964, 145, 548-553

(3) BOREK E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1963, 18, 139-148

(4) CANTONI G.L. and DURELL J., *J. Biol. Chem.*, 1957, 255, 1033

(5) BERQUIST P.L. and MATHEWS R.E.F., *Biochem. J.*, 1962, 85, 305-313

(6) FARBER E. and MAGEE P.N., *Biochem. J.*, 1960, 76, 582

(7) MAGEE P.N. and FARBER E., *Biochem. J.*, 1962, 83, 114-124

(8) TSUTUI E., SRINIVASAN P.R. and BOREK E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1966, 56, 1003-1009

(9) HANCOCK R.L., *Cancer Res.*, 1967, 27, 646-653

10) Mc FARLANE E.S. and SHAW G.H., *Can. J. Microbiol.*, 1968, 14, 499-502

11) MITTELMAN A., HALL R.H., YOHN D.S. and GRACE J.T., *Cancer Res.*, 1967, 27, 1409-1414

12) HACKER B. and MANDEL L.R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 190, 38-51

13) MANDEL L.R., HACKER B. and MAAG T.A., *Cancer Res.*, 1969, 29, 2229-2231

14) KIT S., NAKAJIMA K. and DUBBS D.R., *Cancer Research*, 1970, 30, 528-534

15) BREIER B. and HOLLEY R.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 213, 365-370

16) KAYE A.M. and LEBOY P.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 157, 289-301

17) BAGULEY B.C. and STAEHELIN M., *European J. Biochem.*, 1968, 6, 1

18) HO Y. and JU LIN H., *Br. J. Cancer*, 1974, 29, 324-327

19) KLAGSBRUN M., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, n° 23, 7443-7451

20) RUDEH R., FELDMAN M. and LITTAUER U.Z., *Biochemistry*, 1967, 6, n° 2, 451-460

21) LEBOY P.S., *Febs Lett.*, 1971, 16, 117-120

22) PEGG A.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 232, 630-642

23) SEILER N. and LAMBERTY U., *Comp. Biochim. Physiol.*, 1975, 52B, 419-425

24) RUSSEL D.H., LEVY C.C., SCHIMPFF S.C. and HAWK I.A., *Cancer Res.*, 1971, 31, 1555

25) DREYFUSS F., CHAYEN R., DREYFUSS G., DVIR R. and RATAN J., *Israel J. Med. Sci.*, 1975, 11, 785

26) NISHIOKA K. and ROMSDAHL M.M., *Clinica Chim. Acta*, 1974, 57, 155

27) MARTON L.J., RUSSEL D.H. and LEVY C.C., *Clin. Chem.*, 1973, 19, 923

28) MARTON L.J., VAUGHN J.G., HAWK I.A., LEVY C.C. and RUSSEL D.H., *in "Polyamines in Normal and Neoplastic Growth" (edited by D.H. Russel), New-York*, 1973, 367

29) HEBY O., MARTON L.J., WILSON C.B. and MARTINEZ H.M., *J. Cell Physiol.*, 1975, 86, 511-522

30) DESSER H., HÖCKER P., WEISER M. and BÖHNEL J., *Clinica Chimica Acta*, 1975, 63, 243-247

(31) BACHRACH U., DON S. and WIENER H., *Cancer Res.*, 1974, 34, 1577-1580

(32) PROCTOR M.S., FLETCHER H.V., SHUKLA J.B. and RENNERT O.W., *J. Invest. Dermatol.*, 1975, 65, 409-411

(33) RIDDICK D.H. and GALLO R.C., *Cancer Res.*, 1970, 30, 2484-2492

(34) RIDDICK D.H. and GALLO R.C., *Blood*, 1971, 37, 282-292

(35) RIDDICK D.H. and GALLO R.C., *Blood*, 1971, 37, 293-298

(36) GALLO R.C., *Cancer Res.*, 1971, 31, 621-629

(37) KERR S.J., *Biochemistry*, 1970, 9, n° 3, 690-695

(38) KERR S.J., SHARMA O.K. and BOREK E., *Cancer Research*, 1971, 31, 633-636

(39) KERR S.J., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, n° 13, 4248-4252

(40) KERR S.J. and HEADY J.E., *Adv. Enzyme Regulation*, 1974, 12, 103-117

(41) HEADY J.E. and KERR S.J., *Cancer Res.*, 1975, 35, 640-643

(42) GLICK J.M., ROSS S. and LEBOY P.S., *Nucleic Acids Res.*, 1975, 2, n° 10, 1639-1651

(43) ZAPPIA V., ZYDEK-CWICK C.R. and SCHLENK F., *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4499-4509

(44) DEGUCHI T. and BARCHAS J., *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 3175-3181

(45) PEGG A.E., *Febs Letters*, 1971, 16, 13-16

(46) HILDESHEIM J., HILDESHEIM R. and LEDERER E., *Biochimie*, 1971, 53, 1067-1071

(47) HILDESHEIM J., HILDESHEIM R. and LEDERER E., *Biochimie*, 1972, 54 431-437

(48) COWARD J.K. and SWEET W.D., *J. Med. Chem.*, 1972, 15, 381-386

(49) COWARD J.K., BUSSOLOTTI D.L. and CHI-DEN C., *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 1286-1289

(50) BORCHARDT R.T. and SHIONG WU Y., *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 862-868

(51) BORCHARDT R.T., HUBER J.A. and SHIONG WU Y., *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 868-873

(52) BORCHARDT R.T. and SHIONG WU Y., *J. Med. Chem.*, 1975, 18, 300-304

(53) MONTGOMERY J.A., SHORTNACY A.T. and THOMAS J., *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 1197-1207

(54) MICHELOT R., LEGRAVEREND M., FARRUGIA G. and LEDERER E., *Biochimie*, 1975, 58, n° 1-2, 201-205

(55) HILDESHEIM J., HILDESHEIM R., LEDERER E. and YON J., *Biochimie*, 1972, 54, 989-995

(56) HILDESHEIM J., GOGUILLON J.F. and LEDERER E., *Febs Letters*, 1973, 30, 177-180

(57) HILDESHEIM J., HILDESHEIM R., BLANCHARD P., FARRUGIA G. and MICHELOT R. *Biochimie*, 1973, 55, 541-546

(58) TEMIN H. and MIZUTANI S., *Nature*, 1970, 226, 1211

(59) DUESBERG P., HELM K.V. and CANAANI E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1971, 68, 747

(60) GOLDÉ A. and VIGIER P., *Virology*, 1961, 15, 36-46

(61) ROBERT-GERO M., LAWRENCE F. and VIGIER P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1975, 63, 594-600

(62) HAM R.G., *Exp. Cell Res.*, 1963, 29, 515-526

(63) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.Y., FARR A.L. and RANDALL R.Y., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275

(64) HILDESHEIM R., *Diplôme d'études supérieures*, 1973

(65) HILDESHEIM J., BLANCHARD P., HILDESHEIM R., résultats non publiés

(66) BADDILEY J., *J. Chem. Soc.*, 1951, 1348-1351

(67) KUHN.R und JAHN W., *Chem. Ber.*, 1965, 98, 1699-1704

(68) LEGRAVEREND M. and MICHELOT R., manuscrit en préparation

(69) MICHELOT R., résultats non publiés

(70) BLANCHARD P., résultats non publiés

(71) RICHOU M., DEA Université Paris XI, Orsay, 1975

(72) GOLD M., HURWITZ J. and ANDERS M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 11, n° 2, 107-114

(73) KIRBY K.S., *Biochem. J.*, 1957, 66, 495

(74) KIRBY K.S., *Biochem. J.*, 1958, 70, 260

(75) HAM R.G., *Exp. Cell Res.*, 1963, 515-526

(76) HERRMANN R.L., FAIRLEY J.L. and BYERRUM R.U., *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1902-1904